



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Badania związków fenolowych w wybranych gatunkach szalwii (*Salvia* sp.) metodami chromatograficznymi HPLC i TLC

Author: Dorota Staszek

Citation style: Staszek Dorota. (2012). Badania związków fenolowych w wybranych gatunkach szalwii (*Salvia* sp.) metodami chromatograficznymi HPLC i TLC. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Dorota Staszek

**Badania związków fenolowych w wybranych
gatunkach szalwii (*Salvia sp.*) metodami
chromatograficznymi HPLC i TLC**

praca doktorska

Promotorzy pracy:

prof. dr hab. Teresa Kowalska

Zakład Chemii Ogólnej i Chromatografii

Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach

prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos

Katedra Chemii Nieorganicznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Promotor pomocniczy:

dr Mieczysław Sajewicz

Zakład Chemii Ogólnej i Chromatografii

Instytut Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach



**Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski
Katowice, 2012**

Składam serdeczne podziękowania

*Pani prof. dr hab. Teresie Kowalskiej
oraz Pani prof. dr hab. Monice Waksmundzkiej-Hajnos
za opiekę naukową, poświęcony czas oraz wszechstronną pomoc
w trakcie wykonywania badań i redagowania niniejszej pracy*

*Panu dr Mieczysławowi Sajewiczowi
za cenne rady oraz pomoc w trakcie prowadzenia badań*

*Rodzicom i bratu
za wyrozumiałość, cierpliwość
oraz ogromne wsparcie, które dodawało mi sił*

*Koleżankom i kolegom z „55”
za spędzone razem niezapomniane chwile*

Pracę dedykuje moim ukochanym Rodzicom

Spis treści

I. WSTĘP	9
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	11
1. Charakterystyka botaniczna badanych gatunków szalwii.....	13
1.1. Systematyka szalwii	13
1.2. Krótki opis wybranych gatunków szalwii.....	14
1.3. Wybrane klasy związków chemicznych zawartych w szalwii i ich właściwości farmakologiczne.....	14
1.3.1. Krótka charakterystyka chemiczna kwasów fenolowych i ich właściwości farmakologiczne ..	14
1.3.2. Krótka charakterystyka chemiczna flawonoidów i ich właściwości farmakologiczne	15
2. Metody ekstrakcji	19
3. Przykłady literaturowe wybranych metod ekstrakcji zastosowanych do wyodrębniania kwasów fenolowych z materiału roślinnego.....	23
4. Chemotaksonomia roślin i jej znaczenie dla nowoczesnej systematyki roślin	27
III. CEL PRACY	29
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	33
1. Aparatura i odczynniki	35
2. Metodyka prowadzenia badań	38
2.1. Materiał roślinny.....	38
2.2. Zastosowane metody ekstrakcji związków fenolowych	38
2.2.1. Ekstrakcja tradycyjna.....	38
2.2.2. Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE) z wykorzystaniem różnych ekstrahentów	39
2.2.3. Selektywna ekstrakcja kwasów fenolowych.....	39
2.2.4. Selektywna ekstrakcja flawonoidów	41
2.2.5. Wielostopniowa ekstrakcja związków fenolowych	41
2.3. Analiza ekstraktów roślinnych techniką chromatografii cienkowarstwowej.....	44
2.3.1. Układy chromatograficzne zastosowane do optymalizacji rozdziału ekstraktów <i>szalwii lekarskiej</i> (<i>S. officinalis</i>) uzyskanych metodą tradycyjną oraz metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej	44
2.3.2. Warunki chromatografowania ekstraktu szalwii lekarskiej (<i>S. officinalis</i>) uzyskanego metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej techniką chromatografii preparatywnej (PLC)	45
2.3.3. Układy chromatograficzne zastosowane do rozdziału ekstraktów dwudziestu gatunków szalwii uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej.....	45
2.3.4. Specjalne techniki rozwijania w analizie metanolowych ekstraktów szalwii	47
2.3.5. Warunki chromatografowania zastosowane podczas określenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów szalwii przy użyciu stabilnego rodnika DPPH	48
2.3.6. Układy chromatograficzne zastosowane do optymalizacji rozdziału ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji związków fenolowych (TLC-MS vs. TLC-LC-MS).....	49
2.3.7. Układy chromatograficzne zastosowane do optymalizacji rozdziału ekstraktów uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych	50
2.4. Analiza ekstraktów roślinnych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej	52
2.4.1. Warunki rozdziału zastosowane podczas porównania metod ekstrakcji oraz do analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej.....	52
2.4.2. Warunki rozdziału zastosowane podczas eksperymentu TLC-LC-MS dla ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji związków fenolowych.....	53
2.4.3. Warunki rozdziału zastosowane podczas analizy jakościowej ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji flawonoidów	54
2.4.4. Warunki rozdziału zastosowane podczas analizy jakościowej ekstraktów uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych.....	54
2.5. Oznaczenia spektrofotometryczne sumy zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów	55
2.5.1. Spektrofotometryczne oznaczanie sumy zawartości kwasów fenolowych	55
2.5.2. Spektrofotometryczne oznaczanie sumy zawartości flawonoidów	55
2.6. Chemometryczna analiza chromatogramów cieczowych zastosowana do wybranych ekstraktów szalwii.....	56
2.6.1. Eliminacja tła sygnału analitycznego	56
2.6.2. Usuwanie szumu z sygnału analitycznego.....	56
2.6.3. Nakładanie sygnałów analitycznych.....	57
2.6.4. Analiza czynników głównych (PCA)	58

2.6.5. Dyskryminacyjna metoda częściowych najmniejszych kwadratów.....	58
3.1. Zastosowane metody ekstrakcji składników chemicznych z materiału roślinnego na przykładzie szałwii lekarskiej (<i>S. officinalis</i>)	60
3.1.1. Porównanie metod ekstrakcji szałwii lekarskiej (<i>S. officinalis</i>) techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z detekcją densytometryczną.....	60
3.1.2. Porównanie metod ekstrakcji szałwii lekarskiej (<i>S. officinalis</i>) techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC/DAD).....	63
3.2. Analiza metanolowych ekstraktów szałwii techniką chromatografii cienkowarstwowej.....	70
3.2.1. Analiza metanolowych ekstraktów szałwii techniką jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej	71
3.2.2. Analiza metanolowych ekstraktów szałwii techniką gradientowego wielokrotnego rozwijania (GMD - <i>Gradient Multiple Development</i>).....	105
3.2.3. Analiza metanolowych ekstraktów szałwii techniką wielokrotnej elucji gradientowej (MGD - ang. <i>Multiple Gradient Development</i>).....	107
3.2.4. Analiza metanolowych ekstraktów szałwii techniką dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D-TLC)	108
3.2.5. Określenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów szałwii uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej przy użyciu stabilnego rodnika DPPH	110
3.4. Analiza chemometryczna metanolowych ekstraktów dwudziestu badanych gatunków szałwii 128	
4. Analiza frakcji związków fenolowych wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji	135
4.1. Analiza spektrofotometryczna kwasów fenolowych i flawonoidów wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji	135
4.2. Analiza frakcji związków fenolowych wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas.....	140
4.2.1. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (1D TLC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym 142	
4.2.2. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie dwuwymiarowym (2D TLC-LC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym 147	
4.2.3. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (1D RP-TLC-MS) Rozdział na fazie stacjonarnej C ₁₈ 152	
4.2.4. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie dwuwymiarowym (2D RP-TLC-LC-MS). Rozdział na fazie stacjonarnej C ₁₈ 158	
4.3. Analiza frakcji flawonoidów wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas	164
4.3.1. Analiza frakcji flawonoidów techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (1D TLC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym 164	
4.3.2. Analiza frakcji flawonoidów techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie dwuwymiarowym (2D TLC-LC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym 170	
4.4. Chromatograficzna i chemometryczna analiza ekstraktów szałwii uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji flawonoidów	176
5. Chromatograficzna i chemometryczna analiza ekstraktów szałwii uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych.....	186
Podsumowanie i wnioski	208
Lista prac własnych tematycznie związanych z rozprawą doktorską	210
Lista publikacji konferencyjnych tematycznie związanych z rozprawą doktorską.....	211
Życiorys	214
LITERATURA	215

I. WSTĘP

Historia leczenia ziołami jest bardzo długa i sięga jeszcze czasów człowieka pierwotnego, bowiem od najdawniejszych czasów rośliny stanowiły pożywienie człowieka i służyły mu również jako pierwsze leki. Współczesna nauka poznaje te historie z nielicznych dowodów dostarczanych przez archeologów. Pierwsze wiadomości o starożytnym lecznictwie odnaleziono w dokumentach Babilonii i Asyrii z okresu około 2000 lat przed naszą erą. Wśród roślin leczniczych wymieniano wówczas rumianek, lulek, szafran, nagietek, koper i wiele innych. Kolebką ziołolecznictwa był Egipt, gdzie uprawą i sporządzaniem leków zajmowali się kapłani. Najwięcej wiadomości o lecznictwie i lekoznawstwie egipskim pochodzi z odnalezionego dwudziestometrowego papiirusa Ebersa. Zawiera on około 900 receptur różnych leków. Wśród surowców pochodzenia roślinnego papiirus wymienia np. jałowiec jako lek moczopędny, korę granatowca jako środek usuwający tasiemca, piołun jako środek pobudzający apetyt, a czosnek jako środek odkażający. Poza tym wymienione są anyż, koper włoski, mięta, tatarak, mirra, mak polny, aloes, siemę lniane i wiele innych. Z kolei Grecja jest ojczyzną ojca medycyny, Hipokratesa z Kos, który w swoim dziele pt. "Corpus Hippocraticum" opisał około 300 leków, w tym 200 pochodzenia roślinnego. Innym znanym autorem jest Pliniusz żyjący w I wieku naszej ery w Rzymie. W księdze XX swego trzydziestosiedmiotomowego dzieła pt. "Historia naturalis", Pliniusz opisał około 1000 roślin wraz z ich działaniem leczniczym i recepturą przyrządzania. Epokę rozkwitu antycznej nauki zamyka okres Galena, najwybitniejszego – obok Hipokratesa – lekarza starożytności i reformatora nauk medycznych. Galen wprowadził wiele nowych form środków leczniczych, takich jak napary, odwary i mazidla. Podzielił on również leki ze względu na ich działanie, np. na środki moczopędne (seler czy pietruszka) i inne. W okresie dziejów nowożytnych gwałtowne poszukiwanie nowych dróg we wszystkich dziedzinach nauki spowodowało również wielki rozkwit ziołolecznictwa, ugruntowany wiedzą o działaniu i charakterze wielu substancji czynnych zawartych w roślinach. Niestety, koniec XIX i początek XX wieku to okres krytyczny w historii ziołolecznictwa. Gwałtowny rozwój przemysłu chemicznego spowodował częściowe wyparcie leków pochodzenia roślinnego przez leki syntetyczne [1, 2].

Obecnie obserwuje się powrót do ziołolecznictwa, związany między innymi z lepszym poznaniem budowy chemicznej i działania farmakologicznego substancji czynnych zawartych w roślinach leczniczych, ale również ze względu na ogromny potencjał, który kryje świat roślin. Na kuli ziemskiej istnieje około 400 tysięcy roślin z czego 40 tysięcy uznaje się za rośliny lecznicze, chociaż wiele z nich nie zostało jeszcze niestety dokładnie przebadanych. Na szczęście zaczęto już doceniać wielkie zalety leku roślinnego, które polegają m.in. na tym, że lek ten jest na ogół znacznie lepiej przyswajany przez organizm niż lek syntetyczny. Zawiera on bowiem całą kompozycję mniej lub bardziej dziś poznanych związków naturalnych, powiązanych ze sobą w korzystne dla organizmu człowieka układy [1, 2].

Szałwia jest rośliną cenioną w ziołolecznictwie już od starożytności. Łacińska nazwa *salvia* posiada sens bycia zdrowym, co świadczy o jej wcześniej rozpoznanych właściwościach leczniczych. Szałwia jest również uprawiana w Polsce i to od kilkuset już lat. Słynny Syreniusz omawiając tę roślinę napisał, że jest ona „prawie wszystkim

znajoma, albowiem zaledwie znaleźć tak mały i nędzny ogródek, w którym by nie była sadzona.” W średniowieczu szalwia była uważana za ziele uniwersalne, podtrzymujące życie, co przyczyniło się do powstania staropolskiego przysłowia: „Tego śmierć nie ubodzie, kto ma szalwię w ogrodzie”. Z kolei w starym łacińskim dziele pt. „O zachowaniu zdrowia” możemy przeczytać:

„Szałwija wzmacnia nerwy i rąk leczy drżenie,
Febre silną przemaga, ciał bezwładnienie.
Z pierwiosnkami, lawendą i bobrowym strojem
I rzeżuchą, obdarza, zdrowiem i spokojem.
Za tak przeważną, znaczną przysługę i wielką
Szałwije zwać poczęto słusznie zbawicielką.”
(przekład F. Chotomskiego) [1, 2].



Rys. 1. *Salvia officinalis* [3]

Na świecie znanych jest około 900 gatunków szalwii. Szałwia posiada głównie właściwości przeciwzapalne i ściągające. Najczęściej jest stosowana przy zapaleniu dziąseł, jamy ustnej, gardła i krtani. Szałwia korzystnie wpływa na funkcjonowanie woreczka żółciowego, przez co znajduje zastosowanie w łagodzeniu dolegliwości układu pokarmowego takich, jak biegunka, nieżyt żołądka i jelit oraz wzdęcia. Zewnętrznie stosuje się ją w postaci okładów w stanach zapalnych skóry takich, jak trądzik, owrzodzenia i ropnie. Szałwia dodatkowo działa przeciwłupieżowo oraz pobudza cebulki włosowe. Znajduje ona również zastosowanie w leczeniu nadmiernej potliwości [1, 2, 4-9].

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Charakterystyka botaniczna badanych gatunków szalwii

1.1. Systematyka szalwii [10]

Poniżej przedstawiono zarys systematyki roślin ze specjalnym uwzględnieniem rodzaju szalwii oraz tych gatunków szalwii, które są przedmiotem niniejszej rozprawy.

Królestwo:	<i>Eucariota</i> – Jądrowce
Podkrólestwo:	<i>Plantae</i> – Rośliny
Gromada:	<i>Spermatophyta</i> - Nasienne
Podgromada:	<i>Angiospermae (Magnoliophyta)</i> - Okrytozalążkowe
Klasa:	<i>Dicotyledoneae (Magnoliopsida)</i> - Dwuliścienne
Podklasa:	<i>Lamiidae</i> - Jasnotowe
Rząd:	<i>Lamiales</i> - Jasnotowce
Rodzina:	<i>Lamiaceae</i> - Jasnotowate
Rodzaj:	<i>Salvia</i> L. - Szalwia
Gatunek:	<i>Salvia amplexicaulis</i> Lam, <i>Salvia argentea</i> L., <i>Salvia atropatana</i> Bunge, <i>Salvia austriaca</i> Jacq., <i>Salvia azurea</i> Mchx., <i>Salvia cadmica</i> Boiss., <i>Salvia canariensis</i> L., <i>Salvia deserta</i> L., <i>Salvia forskahlei</i> L., <i>Salvia glutinosa</i> L., <i>Salvia hians</i> Royle ex Benth, <i>Salvia jurisicii</i> Košanin, <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl, <i>Salvia nemorosa</i> L., <i>Salvia nutans</i> L., <i>Salvia officinalis</i> L., <i>Salvia pratensis</i> L., <i>Salvia pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i> (L.) Briq., <i>Salvia regeliana</i> Trautv., <i>Salvia sclarea</i> L., <i>Salvia staminea</i> Montbret et Aucher., <i>Salvia stepposa</i> Shost., <i>Salvia superba</i> <i>Salvia tesquicola</i> Klokov & Pobed., <i>Salvia triloba</i> L., <i>Salvia verticillata</i> L.

1.2. Krótki opis wybranych gatunków szalwii

Salvia sclarea – szalwia muszkatołowa jest rośliną śródziemnomorską, która rośnie w ciepłych i nasłonecznionych miejscach. Roślina ta jest surowcem antyseptycznym, wiatropędnym i ściągającym. Szalwię muszkatołową stosuje się głównie w leczeniu zaburzeń dyspersyjnych, chorób dróg układu oddechowego oraz problemów menstruacyjnych [7, 9].

Salvia azurea – szalwia ta działa stymulująco na pracę przewodu pokarmowego, pobudza wydzielanie soków trawiennych i posiada również słabe właściwości antyseptyczne [9].

Salvia lavandulifolia – szalwia lawendolistna występuje jedynie na południu Francji i Hiszpanii, i w północno-zachodniej Afryce. Napar z jej liści reguluje trawienie, działa ona także wykrztuśne i oczyszczająco, obniża gorączkę oraz wzmacnia układ odpornościowy. Posiada również zastosowanie w leczeniu zaburzeń menstruacyjnych, nerwic, depresji i psychoz [9].

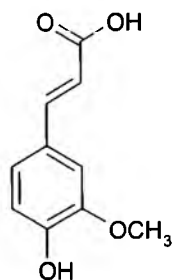
Salvia triloba – szalwia krzewiasta rośnie głównie w Grecji. Stosuje się ją w leczeniu grypy, anginy, kaszlu z przeziębienia oraz bólów reumatycznych [9, 11].

Salvia officinalis – szalwia lekarska; dzięki właściwościom dezynfekcyjnym, kojącym, ściągającym i przeciwzapalnym, napar z jej liści stosowany wewnętrznie korzystnie wpływa na funkcjonowanie pęcherzyka żółciowego i ułatwia trawienie, łagodzi stany zapalne żołądka i jelit, przeciwdziała bieguncie oraz nadmiernej potliwości. Jest środkiem przeciwkaszlowym, przeciwgrzybiczym, a nawet przeciwdepresyjnym. Zalecana jest również do użytku zewnętrznego przy zapaleniach dziąseł oraz błon śluzowych i gardła. [6-9, 11-14].

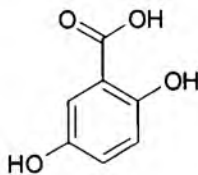
1.3. Wybrane klasy związków chemicznych zawartych w szalwii i ich właściwości farmakologiczne

1.3.1. Krótka charakterystyka chemiczna kwasów fenolowych i ich właściwości farmakologiczne

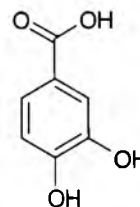
Kwasy fenolowe są to związki mające fenolową grupę hydroksylową i grupę karboksylową. Największe znaczenie mają fenolokwasy pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego. Szczególnie te drugie są wśród roślin bardzo rozpowszechnione w postaci wolnej lub depsydów, a także w połączeniach glikozydowych. Kwasy fenolowe często wchodziły w skład cząsteczek antocyjanów lub flawonów. Ostatnio coraz częściej zwraca się uwagę na te związki jako na substancje mające wpływ immunostymulujący. Szczególne znaczenie w tym zakresie mają połączenia estrowe i glikozydowe kwasu kawowego, a także jego depsydy [12].



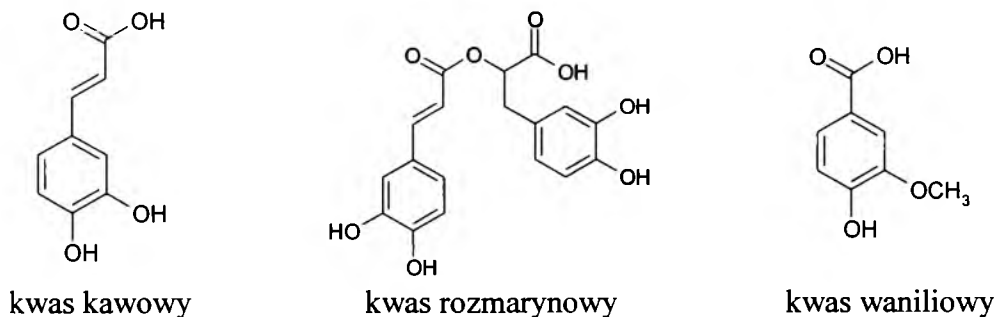
kwas ferulowy



kwas gentyzynowy



kwas protokatechinowy



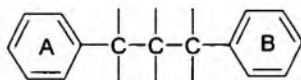
Rys. 2. Wzory strukturalne wybranych kwasów fenolowych.

Kwasy fenolowe to jedna z najliczniejszych grup substancji czynnych. Związki te mają duże znaczenie dla roślin, m. in. biorąc udział w procesach obronnych podczas infekcji, nadmiernego nasłonecznienia i zranień [15]. Biorą one również udział w regulacji kiełkowania nasion i współdziałają w regulacji wzrostu roślin [16].

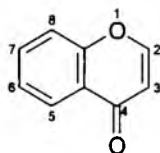
Jedną z najważniejszych cech fenolokwasów jest działanie antyoksydacyjne, które jest ściśle związane z ich budową chemiczną. Wpływ na działanie tych związków ma liczba grup hydroksylowych oraz ich wzajemne położenie w pierścieniu aromatycznym. Najsilniejsze działanie wykazują te kwasy, których podstawniki są położone w pozycji orto- lub para-. Stąd najaktywniejsze kwasy to kwas galusowy, kawowy, chlorogenowy i protokatechowy [17,18,19]. Bardzo silne działanie przeciwutleniające, jak również działanie wzmacniające aktywność enzymów usuwających wolne rodniki, a zarazem hamujące aktywność enzymów biorących udział w ich katalizie, wykazuje kwas ferulowy [20]. Pochodne kwasu kawowego, tj. kwas rozmarynowy, litospermowy i salwianolowy, które zostały wyizolowane z *Salvia milthioriza* posiadają silne właściwości przeciwwirusowe [21].

1.3.2. Krótka charakterystyka chemiczna flawonoidów i ich właściwości farmakologiczne

Flawonoidy są substancjami stałymi, najczęściej żółtymi, rzadziej bezbarwnymi, których podstawowy szkielet składa się z piętnastu atomów węgla. Układają się one w ugrupowania dwóch pierścieni benzenowych połączonych trzema atomami węgla.



Większość flawonoidów między pierścieniami aromatycznymi A i B tworzy układ heterocykliczny. Flawonoidy są więc uważane za pochodne benzo- γ -pironu, czyli chromonu.

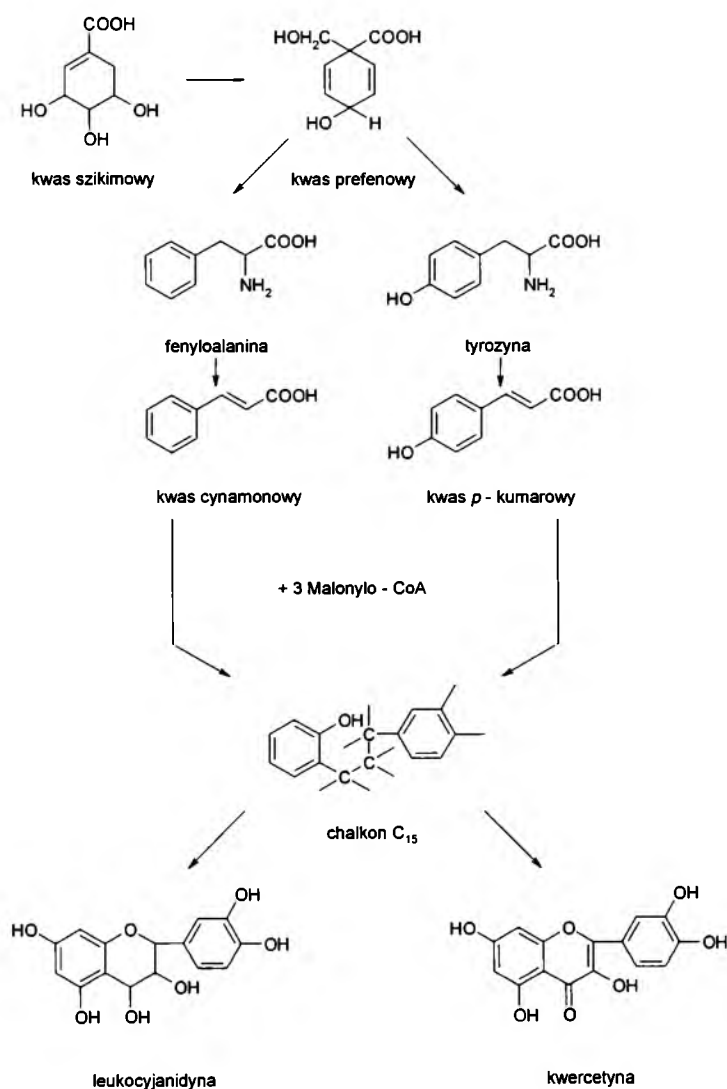


benzo- γ -piron (chromon)

Do tej pory poznano około 800 różnych pochodnych chromonu, które różnią się między sobą liczbą i umiejscowieniem grup hydroksylowych przy obu pierścieniach,

różnym stopniem utlenienia łącznika trójwęglowego, typem połączenia glikozydowego z cukrami prostymi, kwasami cukrowymi i innymi kwasami organicznymi oraz występowaniem układów dimerycznych (tzw. biflawonoidy). Większość flawonoidów występuje w postaci O-glikozydów, których część cukrowa składa się z jednego do pięciu cząsteczek cukrów prostych. Niektóre flawonoidy występują również w postaci C-glikozydów [12].

Biosynteza flawonoidów jest procesem bardzo złożonym. Wyjaśniono, że pierścień aromatyczny A powstaje przy udziale fragmentów malonowych (C_3) w formie aktywowanej koenzymem A. Z kolei fragment C_6-C_3 powstaje z fenylopropanu, którego prekursorem jest kwas cynamonowy. Produktem pośrednim tej biosyntezy jest odpowiedni chalkon. Kwas cynamonowy jest biogenetycznie związany z fenyloalaniną, a pośrednio z kwasem szikimowym. Podobnie kwas *p*-kumarowy związany jest z tyrozyną, co przedstawiono na rys. 3. Cyklizacja kwasu cynamonowego oraz kwasu *p*-kumarowego do chalkonu zachodzi przy udziale dwóch cząsteczek malonylo-koenzymu A. Z produktu pośredniego, jakim jest chalkon, powstaje flawon oraz wszystkie jego możliwe modyfikacje [12].

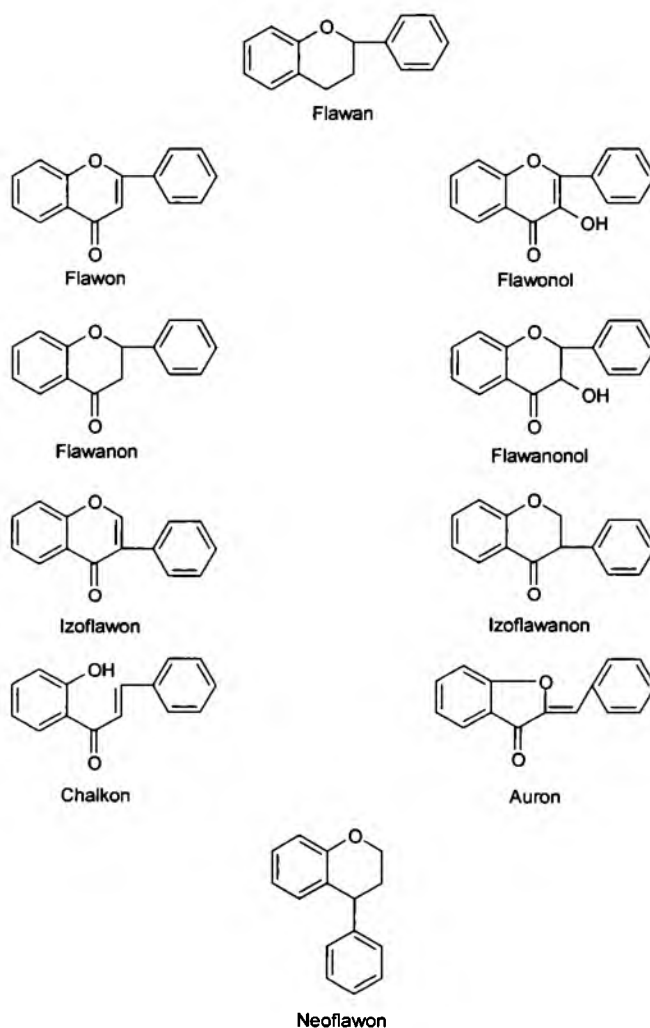


Rys. 3. Schemat biogenezy flawonoidów [12].

Glikozydy flawonoidów są na ogół dobrze rozpuszczalne w wodzie i alkoholu etylowym, natomiast nie rozpuszczają się w takich rozpuszczalnikach, jak chloroform czy benzen. Uwolnione z glikozydów flawonoidy nie rozpuszczają się w wodzie, lecz są na ogół nieźle rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Do charakterystycznych cech tych związków należy zdolność do rozpuszczania się w alkaliach z wytworzeniem żółtego zabarwienia. Istnieje również szereg innych reakcji chemicznych pozwalających na identyfikację tej grupy związków. W tabeli 1 przedstawiono podział flawonoidów ze względu na ich budowę, a na rys. 4. przedstawiono podstawowe struktury flawonoidów[12].

Tab. 1. Podział flawonoidów ze względu na ich budowę.

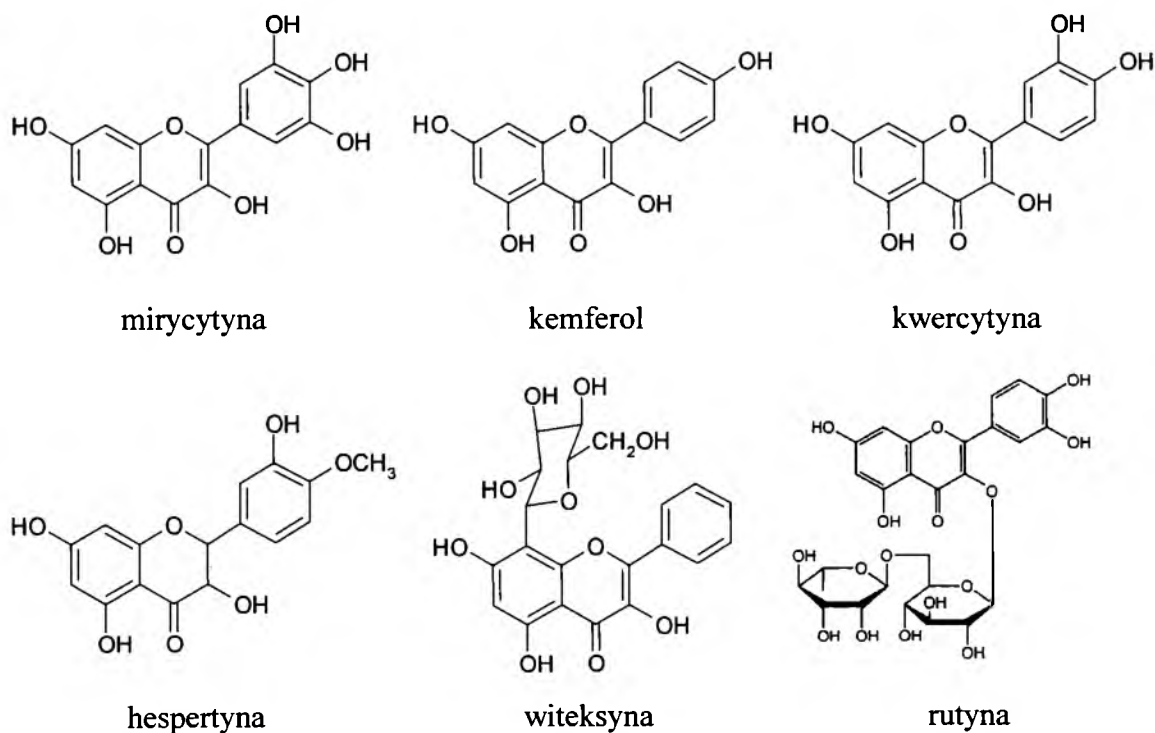
FLAWONOIDY		
Pochodne izoflawanu	Pochodne flawanu	Inne flawonoidy
Izoflawonony	Flawonony	Chalkony
Izoflawony	Flawony	Aurony
	Flawanonole	Biflawonoidy
	Flawonole	Flawonolignany
		Pterokarpany i kumestany
		Rotenonony



Rys. 4. Podstawowe struktury flawonoidów [12].

Flawonoidy są grupą substancji, których działanie biologiczne związane jest przede wszystkim z naczyniami krwionośnymi i układem krążenia, jednak niektóre z nich wywierają bardziej rozległy wpływ na cały organizm. Takie flawonoidy, jak apigenina, luteolina, kemferol i genisteina bezpośrednio wpływają na rozszerzanie się naczyń krwionośnych [22]. Związki te wykazują również znakomite właściwości uszczelniania naczyń krwionośnych, działając tym samym przeciwzapalnie. Z tego właśnie powodu rutyna często występuje w preparatach zawierających witaminę C. Oprócz zmniejszania przepuszczalności naczyń krwionośnych spowalnia utlenianie witaminy C, tym samym przedłużając jej działanie [23].

Kompleks takich bioflawonoidów, jak sylibina, sylidianina i sylikrystyna, zwany sylimaryną, jest środkiem stosowanym w leczeniu dolegliwości wątroby. Najczęstszym wskazaniem do stosowania tego środka są choroby wątroby związane z alkoholizmem oraz ostre wirusowe zapalenie tego narządu [24,25,26].



Rys. 5. Wzory strukturalne wybranych flawonoidów i ich glikozydów.

2. Metody ekstrakcji [27]

Techniki ekstrakcyjne odgrywają szczególną rolę na etapie izolacji i wzbogacania analitów z próbek środowiskowych. Są one stosowane w analityce śladowych składników zarówno próbek ciekłych, stałych, jak i gazowych. W trakcie procesu ekstrakcji odbywa się transport analitów z próbki (matrycy pierwotnej) do matrycy odbierającej (matrycy wtórnej), która ma zazwyczaj prosty i jednoznacznie określony skład chemiczny. Wprowadzenie do procedury analitycznej operacji ekstrakcji daje zazwyczaj wiele następujących korzyści:

1. Przeniesienie analitów do matrycy o znacznie prostszym składzie niż matryca pierwotna próbki, najczęściej bardziej odpowiednim z punktu widzenia technik oznaczeń końcowych. W technikach chromatograficznych, bardzo często wykorzystywanych w analizie próbek środowiskowych, takimi „przyjaznymi” w stosunku do kolumn i detektorów są rozpuszczalniki organiczne lub gaz nośny.
2. Zmniejszenie interferencji na dalszych etapach analizy (szczególnie istotne na etapie oznaczania) w wyniku przeniesienia do matrycy odbierającej tylko niektórych składników analizowanej próbki.
3. Możliwość podniesienia stężenia analitu w matrycy odbierającej (wzbogacanie) do poziomu wyższego niż granica oznaczalności wykorzystywanej techniki i przyrządu pomiarowego. Według definicji przyjętej przez IUPAC terminem wzbogacanie określa się każdą operację lub proces, w wyniku którego zwiększa się stosunek stężeń lub ilości mikroskładników (analitów) do makroskładników (matrycy) analizowanej próbki.

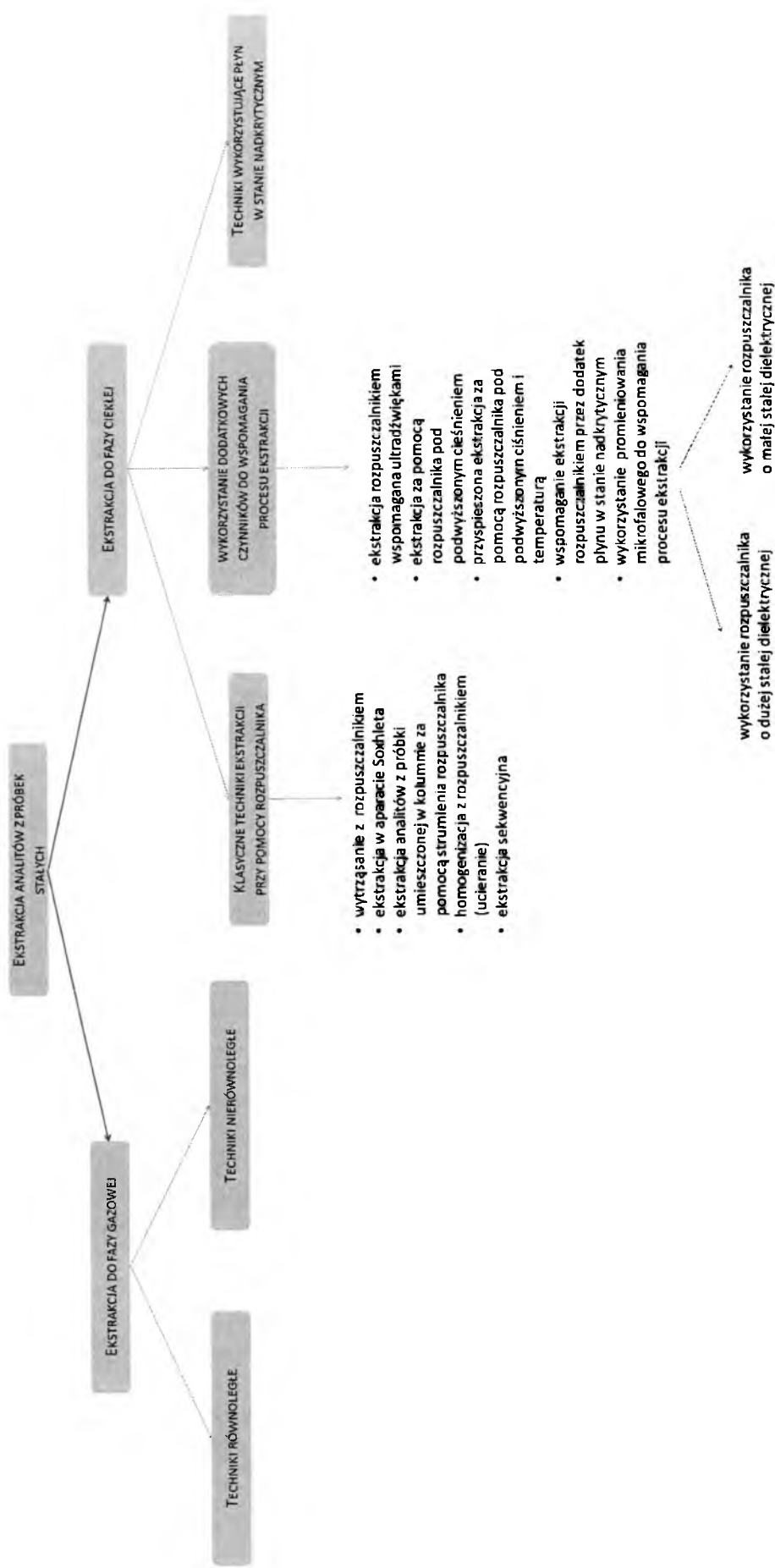
Nie należy jednak zapominać, że z ekstrakcją, jak z każdym procesem w procedurze analitycznej, jest związana możliwość straty części analitów oraz zanieczyszczenia próbki.

Próbki stałe są typowym przykładem próbek środowiskowych, których stan skupienia uniemożliwia bezpośrednie oznaczanie za pomocą większości metod stosowanych w analityce próbek środowiskowych. Przeprowadzanie analitów do matrycy ciekłej lub gazowej jest tu szczególnie istotne, umożliwia bowiem zastosowanie w analizie tych próbek technik chromatograficznych, najczęściej stosowanych w analityce próbek środowiskowych.

Podobnie jak w przypadku próbek ciekłych, ekstrakcja cieczą (*SLE* – ang. *Solid Liquid Extraction*) odgrywa ogromną rolę w analityce próbek stałych. Również w tym przypadku trwają poszukiwania nowych rozwiązań metodycznych i aparaturowych. Mają one na celu zwiększenie skuteczności procesu, skrócenie czasu jego trwania oraz zmniejszenie kosztów i uciążliwości przez zredukowanie objętości użytych rozpuszczalników. Obecnie stosowane techniki ekstrakcji próbek stałych cieczą można podzielić na trzy grupy:

- techniki „klasyczne”,
- nowoczesne rozwiązania, w których do wspomagania procesu ekstrakcji wykorzystuje się dodatkowe czynniki (ultradźwięki, promieniowanie mikrofalowe itp.),
- techniki, w których wykorzystuje się płyny w stanie nadkrytycznym.

Wśród klasycznych technik ekstrakcji analitów z próbek stałych można wyróżnić m.in. następujące rozwiązania:



Rys. 6. Klasyfikacja technik ekstrakcji analitów z próbek stałych [27].

❖ ***Ekstrakcja za pomocą strumienia rozpuszczalnika.***

Próbka jest umieszczona w kolumnie i ogrzewana do temperatury zbliżonej do temperatury wrzenia używanego rozpuszczalnika. Przez układ jest przepompowywany strumień rozpuszczalnika. Warunki ekstrakcji są zbliżone do warunków ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Zaletą tej techniki jest to, że ekstrahowana próbka styka się ciągle z nowymi porcjami rozpuszczalnika w wysokiej temperaturze, co znacznie intensyfikuje proces. W literaturze anglojęzycznej technika ta jest znana pod terminami *forced flow leaching* lub *percolation*.

❖ ***Ekstrakcja w aparacie Soxhleta***

Próbka przeznaczona do ekstrakcji jest umieszczona w porowatym pojemniku (gilzie) i przenoszona do aparatu Soxhleta. Tam gorący kondensat destylującego w zamkniętym obiegu rozpuszczalnika ekstrahuje substancje organiczne z próbki. Dzięki zamkniętemu obiegowi i destylacji rozpuszczalnika próbkę można ekstrahować wielokrotnie świeżymi porcjami, przy stosunkowo niewielkiej ilości użytego medium ekstrahującego. Ten typ ekstrakcji jest procesem dość powolnym, nie jest jednak bardzo pracochłonny, nie wymaga bowiem ciągłego nadzoru. Zastosowanie automatycznych zestawów do prowadzenia ekstrakcji przyspiesza jej przebieg oraz umożliwia zmniejszenie zużycia odczynników.

Kolejną grupą technik ekstrakcyjnych stosowanych w analityce próbek stałych są techniki wykorzystujące dodatkowe czynniki wspomagające proces ekstrakcji analitów za pomocą rozpuszczalnika. Mimo różnego nazewnictwa, należy je zdaniem różnych autorów nadal zaliczać do technik ekstrakcji do fazy ciekłej. Zatem do nowoczesnych technik z wykorzystaniem dodatkowych czynników służących do wspomagania procesu ekstrakcji m.in. zaliczają się:

❖ ***Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (USAE- ultrasonic assisted extraction)) - sonikacja***

Naczynie z próbą i dodanym rozpuszczalnikiem jest umieszczane w łaźni ultradźwiękowej. Ultradźwięki są źródłem dodatkowej energii, ułatwiającej uwolnienie niektórych analitów z matrycy próbki. W tej technice można prowadzić kilka procesów ekstrakcji równolegle, korzystając jednocześnie z tej samej łaźni ultradźwiękowej. Metoda ta ma jednak pewną wadę, a mianowicie występuje konieczność filtracji po zakończeniu procesu ekstrakcji.

❖ ***Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE- microwave assisted extraction)***

W połowie lat osiemdziesiątych technikę mikrofalową wykorzystywano w procesach rozkładu próbek, jednak od niedawna energia mikrofal jest również wykorzystywana do wspomagania procesów ekstrakcji analitów z próbek stałych [za pomocą rozpuszczalnika. Proces przebiega z wykorzystaniem zjawiska absorpcji energii mikrofal przez cząstki związków chemicznych. Z reguły stosuje się urządzenia generujące promieniowanie o częstotliwości 2,45 GHz. Procesy ekstrakcji prowadzi się w bombach teflonowych, kwarcowych lub w naczyniach wykonywanych

z materiałów kompozytowych. Najczęściej używanymi rozpuszczalnikami są dichlorometan oraz mieszanina aceton-heksan. W praktyce analitycznej zastosowano dwa sposoby prowadzenia ekstrakcji wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym. W pierwszym sposobie proces ekstrakcji prowadzi się w naczyniu wykonanym z materiału, który nie absorbuje mikrofal. Do ekstrakcji używa się rozpuszczalnika o możliwie dużej stałej dielektrycznej, który w związku z tym silnie absorbuje mikrofałe. Prowadzi to do ogrzania rozpuszczalnika do temperatury wyższej od jego temperatury wrzenia (w warunkach normalnych) na skutek wysokiego ciśnienia panującego w bombie. Ten sposób ekstrakcji jest bardzo zbliżony do techniki przyspieszonej ekstrakcji – wysokie ciśnienie i temperatura ułatwiają uwalnianie analitów z próbki. W drugim sposobie do ekstrakcji wykorzystuje się rozpuszczalnik o możliwie małej wartości stałej dielektrycznej, który słabo absorbuje mikrofałe. W tym przypadku próbki można także umieścić w otwartym naczyniu. Próbka nagrzewa się pod wpływem promieniowania, ponieważ zawiera zazwyczaj wodę oraz inne składniki o wysokich wartościach stałej dielektrycznej, co ułatwia proces ekstrakcji. Ten sposób ekstrakcji, dzięki niższym temperaturom procesu, jest stosowany przy ekstrakcji analitów termolabilnych, np. z grupy pestycydów chloroorganicznych.

Do podstawowych zalet technik ekstrakcyjnych z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego należy zaliczyć:

- skrócenie czasu ogrzewania próbki i czasu trwania procesu ekstrakcji,
- zmniejszenie gabarytów urządzeń stosowanych do prowadzenia ekstrakcji,
- łatwość kontroli procesu ogrzewania próbki,
- zmniejszenie ilości używanych rozpuszczalników, a więc i ilości toksycznych ścieków,
- wykorzystanie praktycznie całej energii wyłącznie do ogrzania próbki i rozpuszczalnika.

Należy jednak podkreślić fakt, iż zazwyczaj po ekstrakcji, a przed przystąpieniem do oznaczeń konieczne jest jeszcze:

- oddzielenie ekstraktu od matrycy próbki (dekantacja lub filtracja),
- dodatkowe wzbogacanie (odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika),
- oczyszczenie i osuszenie ekstraktu.

Ponadto główną wadą tej metody jest to, że występuje tylko pojedyncze naczynko ekstrakcyjne. Dodatkowo jest to technika trudna do zautomatyzowania, co uniemożliwia ekstrakowanie wielu próbek jednocześnie.

❖ *Ekstrakcja pod zwiększonym ciśnieniem (ASE – accelerated solvent extraction)*

Ekstrakcja przebiega w tym przypadku pod podwyższonym ciśnieniem i w podwyższonej temperaturze. Ostatnio w literaturze pojawiła się nowa nazwa tej techniki *PFE - pressurised fluid extraction*). Zestaw do ekstrakcji składa się ze zbiornika z rozpuszczalnikiem, pompy wykorzystywanej do wypełnienia układu rozpuszczalnikiem, naczynia ekstrakcyjnego, wykonanego najczęściej z kwasoodpornej stali i umieszczonego w piecu, odbieralnika ekstraktu oraz butli z azotem, służącym do wymuszania ruchu rozpuszczalnika przez naczynie ekstrakcyjne w czasie pracy urządzenia. Proces ekstrakcji rozpoczyna wypełnienie całego układu zimnym rozpuszczalnikiem. Następnie naczynie z próbką jest ogrzewane do zadanej temperatury. Ciśnienie w układzie, na skutek podgrzania, podwyższa się i w tych warunkach odbywa się ekstrakcja. Anality z naczynia ekstrakcyjnego wypłukuje się

świeżą porcją rozpuszczalnika, którego ruch jest wymuszony nadciśnieniem azotu podawanego z butli. W ekstrakcji tego typu łatwo uzyskuje się oddzielenie ekstraktu od matrycy. Zwiększenie szybkości ekstrakcji jest zapewnione przez korzystne właściwości gorących rozpuszczalników przy podwyższonym ciśnieniu (mała lepkość, duża siła rozpuszczania, zwiększona wartość współczynników dyfuzji). Technikę tę można z powodzeniem wykorzystać do ekstrakcji takich analitów, jak aflatoksyny, pestycydy, dioksyne, polichlorowane bifenyle, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, występujące w różnych matrycach: glebowych, osadach dennych, pyłach, materiale roślinnym, tkankach itp.

❖ ***Ekstrakcja z zastosowaniem płynów w stanie nadkrytycznym (SFE - ang. Supercritical Fluid Extraction).***

W tej metodzie ekstrakcji rozpuszczalnikiem działającym na próbkę jest płyn w stanie nadkrytycznym. Taki stan osiąga się po przekroczeniu punktu krytycznego w układzie ciśnienie – temperatura. W warunkach nadkrytycznych związek chemiczny nie jest ani gazem, ani cieczą. Natomiast charakteryzuje się korzystnymi z punktu widzenia ekstrakcji, właściwościami, które są związane z tymi dwoma typami postaci materii. Wartość współczynnika dyfuzji dla płynu w stanie nadkrytycznym jest o rząd wielkości większa niż wartość współczynnika dyfuzji dla cieczy, lepkość płynu zaś w tym stanie jest o dwa rzędy wielkości mniejsza od lepkości cieczy, a tylko o rząd wielkości większa niż lepkość gazu. Ekstrakcję z zastosowaniem płynów w stanie nadkrytycznym można przeprowadzić w trzech etapach. W pierwszym etapie następuje uwolnienie analitów z matrycy próbki do płynu w stanie nadkrytycznym. W drugim, przeniesienie analitów z ekstraktora do odbieralnika, natomiast w trzecim etapie następuje zbieranie analitów w odbieralniku po przejściu płynu w stanie nadkrytycznym przez ogranicznik.

3. Przykłady literaturowe wybranych metod ekstrakcji zastosowanych do wyodrębniania kwasów fenolowych z materiału roślinnego

Wpływ na wydajność ekstrakcji kwasów fenolowych z materiału roślinnego ma przede wszystkim natura chemiczna tych związków, jak np. polarność, kwasowość oraz zdolność do tworzenia wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi pierścienia aromatycznego oraz grupami karboksylowymi w przypadku wolnych kwasów fenolowych. Wybór odpowiedniej metody ekstrakcji zależy od wielkości próbki, warunków oraz czasu jej przechowywania, jak również od obecności substancji interferujących. Kwasy fenolowe mogą występować w materiale roślinnym w formie wolnej lub związanej w postaci estrów czy glikozydów [28,29].

W roślinie większość kwasów fenolowych jest przechowywana w wakuolach, skąd zwykle są ekstrahowane przy użyciu m.in. rozpuszczalników organicznych. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami podczas izolacji kwasów fenolowych są gorąca woda, etanol, aceton, eter dietylowy, chloroform, octan etylu oraz metanol (lub wodne roztwory metanolu), z czego ten wymieniony jako ostatni jest najczęściej wykorzystywany.

Escarpa i in. w swojej pracy przedstawili metodę ekstrakcji kwasów fenolowych z jabłek i gruszek przy użyciu jako ekstrahenta czystego metanolu oraz z zielonej fasoli i soczewicy przy użyciu 80% wodnego roztworu metanolu [28]. Najnowsze badania pokazują, że największą wydajność ekstrakcji kwasów fenolowych dla oliwy z oliwek osiągnięto używając 80% wodnego roztworu metanolu [28,30,31].

Kolejne badania dotyczyły skuteczności różnych metod ekstrakcji wykorzystujących jako rozpuszczalnik metanol oraz jego wodne roztwory. Użyto następujących metod ekstrakcji ciało stałe-ciecz: ekstrakcję w aparacie Soxhleta, ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami, ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym oraz ciśnieniową ekstrakcję cieczową [32,33,34,35,36]. W aparacie Soxhleta przeprowadzono wyczerpującą ekstrakcję trwającą 15 h przy użyciu tego samego rozpuszczalnika. Z kolei ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami prowadzono przez 30 minut z wykorzystaniem jako ekstrahenta czystego metanolu. Następnie materiał roślinny przesączono i ponownie ekstrahowano nową porcją rozpuszczalnika na łaźni ultradźwiękowej. Całą procedurę powtórzono trzykrotnie, a następnie wszystkie zebrane ekstrakty połączono. Proces ekstrakcji prowadzono w temperaturze pokojowej ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) oraz w 60°C . Ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym przeprowadzono w dwóch etapach z wykorzystaniem 80% wodnego roztworu metanolu: przy 40% mocy generatora (400W) w czasie 1 minuty oraz przy 60% mocy generatora (600W) w czasie 30 minut. Ekstrakcję przeprowadzono zarówno w układzie otwartym, jak i zamkniętym. Ciśnieniową ekstrakcję cieczową przeprowadzono przy użyciu 80% wodnego roztworu metanolu (dla kwiatów *Sambucus nigra* L.) lub przy użyciu czystego metanolu (dla zieleń *Polygonum aviculare* L.) w następujących warunkach: ciśnienie 60 barów, temperatura 100°C , czas 10 minut [32]. Największą wydajność ekstrakcji kwasu protokatechowego, p-hydroksybenzoesowego, wanilinowego oraz ferulowego w przypadku kwiatostanu *Sambucus nigra* wykazała ekstrakcja przeprowadzona w aparacie Soxhleta. Pozostałe zastosowane metody ekstrakcji wykazały mniejszą wydajność izolacji wyżej wymienionych kwasów fenolowych. Z kolei największą wydajność ekstrakcji kwasu protokatechowego, p-hydroksybenzoesowego i galusowego w przypadku zieleń *Polygonum aviculare* uzyskano podczas ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym w układzie zamkniętym. Największą wydajność izolacji kwasu ferulowego z zieleń *Polygonum aviculare* uzyskano podczas ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami. Dla badanych kwasów fenolowych wykorzystanie ultradźwięków zaowocowało większą (dla kwasu protokatechowego i p-hydroksybenzoesowego) lub podobną (dla kwasu galusowego) wydajnością ekstrakcji z zieleń *Polygonum aviculare* jak w przypadku długotrwałej, wyczerpującej ekstrakcji w aparacie Soxhleta [32].

W innym badaniu została przetestowana i zoptymalizowana metoda ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym w celu izolacji kwasów fenolowych (galusowego, protokatechowego, p-hydroksybenzoesowego, chlorogenowego, wanilinowego, kawowego, syryngowego, p-kumarowego, ferulowego, benzoesowego, rozmarynowego i cynamonowego) z różnych roślin. Badano wpływ warunków ekstrakcji takich, jak skład ekstrahenta, temperatura oraz czas ekstrakcji. Wydajność ekstrakcji porównano z wynikami uzyskanymi podczas kontrolowanej komputerowo dwustopniowej ekstrakcji opartej na zasadzie działania aparatu Soxhleta [36].

Podczas ekstrakcji wspomaganą promieniami mikrofalowymi 1 g suchego materiału roślinnego ekstrahowano 10, 20 i 30 ml wody, 0,1 i 2 mol/dm³ roztworem kwasu solnego, a każda próbka mieszaniny woda – kwas solny dodatkowo zawierała w stosunku objętościowym 0%, 10%, 20% i 30% metanolu. Temperaturę ekstrakcji zmieniano od 40°C do 90°C co 10°C . Czas trwania ekstrakcji wynosił 10, 15, 20, 25 i 30 minut. Próbkę traktowano impulsowym promieniowaniem mikrofalowym o maksymalnej mocy 500W. Najlepsze rezultaty uzyskano dla metody zaproponowanej w celu ekstrakcji związków fenolowych z *Dactylis glomerata*. Ostatecznie procedurę analityczną opierającą się na ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym w celu izolacji związków fenolowych z kilku roślin przeprowadzono z wykorzystaniem

2-molowego kwasu solnego, w następujących warunkach: temperatura 70°C, czas 20 minut [36].

Stwierdzono, że bardziej odpowiednią metodą ekstrakcji jest ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym ze względu na krótszy czas ekstrakcji oraz mniejsze wartości odchylenia standardowego, spowodowane bardziej stabilnymi warunkami (temperatura i czas) prowadzenia ekstrakcji. Wartość odchylenia standardowego dla ekstrakcji wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym mieści się w zakresie 3,2%-5,8%, natomiast dla ekstrakcji prowadzonej w aparacie Soxhleta wynosi od 4,0% do 9,8%. Odzysk dla wzorca wewnętrznego (kwas *m*-kumarowy) w przypadku ekstrakcji wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym wynosił 90%, co oznacza 10% strat wynikających z przygotowaniem ekstraktu do dalszej analizy. Z kolei odtwarzalność sprawdzana z dnia na dzień oraz w pięciodniowym teście wyniosła odpowiednio 3,0%-6,1% oraz 3,9%-6,8% [36].

Odnotowano również procedurę ekstrakcji kwasów fenolowych z materiału roślinnego wodą w stanie nadkrytycznym. Metoda ta opierała się na użyciu gorącej wody, powyżej temperatury wrzenia pod ciśnieniem które jest wystarczające do utrzymania stanu ciekłego, tj. 15 barów w temperaturze 200°C lub 85 barów w 300°C. Wydajność ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym zależy od temperatury, czasu ekstrakcji, jak również od obecności niewielkich ilości rozpuszczalników organicznych i surfaktantów. W niższej temperaturze woda jest bardzo polarnym rozpuszczalnikiem, jednak w wyższych temperaturach ($\geq 250^{\circ}\text{C}$) polarność wody pod ciśnieniem jest podobna do polarności rozpuszczalników organicznych. Tak więc polarny kwas rozmarynowy był lepiej ekstrahowany w niższej temperaturze (100°C), podczas gdy mniej polarny kwas karnozolowy ekstrahowano z większą wydajnością w wyższej temperaturze (200°C) [37].

Smolarz w swojej pracy przedstawiła metodę ekstrakcji kwasów fenolowych oraz ich eterów metylowych z gatunków *Polygonum* L. z wykorzystaniem jako ekstrahenta chloroformu [38]. Z kolei Krygier i in. ekstrahowali wolne oraz związane estrowo kwasy fenolowe z nasion oleistych roślin używając w tym celu mieszaniny metanolu, acetonu i wody w stosunku objętościowym 7 : 7 : 6 [29]. Kwas chlorogenowy skutecznie wyekstrahowano z ziela gryki podczas maceracji w 30% etanolu w 60°C w czasie 2 godzin [29,37].

Użyto różnych rozpuszczalników podczas ekstrakcji głównych polifenoli z liści *Orthosiphon stamineus*. Rozdrobnione liście ekstrahowano następującymi rozpuszczalnikami: wodą destylowaną, 50% wodnym roztworem metanolu, metanolem, 70% wodnym roztworem acetonu i chloroformem w czasie 2, 4 i 8 godzin na łaźni wodnej w temperaturze 40°C. Najwyższą zawartość kwasu rozmarynowego odnotowano podczas ekstrakcji 50% wodnym roztworem metanolu w czasie 4 godzin. Jednakże zawartość tego związku była również wysoka w przypadku ekstraktów: wodnego, metanolowego oraz 70% wodnego roztworu acetonu. Pochodne kwasu kawowego, wliczając kwas rozmarynowy stanowiły 67% zidentyfikowanych fenoli w wodnych roztworach metanolu oraz około 94,6% w wodnych ekstraktach [39].

Leage i in. w swojej pracy przedstawili metodę ekstrakcji kwasów fenolowych z bawełny. Wysuszone próbki ekstrahowano porcjami 6 ml 2% roztworu lodowatego kwasu octowego, a całość ogrzewano na łaźni wodnej przez 10 minut, a następnie wirowano przez 15 minut. Odwirowany ekstrakt przefiltrowano i poddano hydrolizie [40].

Przeprowadzenie hydrolizy estrów i glikozydów w celu uwolnienia kwasów fenolowych znacznie upraszcza dalszą analizę. W literaturze znane są dwie najważniejsze procedury uwalniania związanych kwasów fenolowych. Aby uwolnić

kwasy fenolowe związane glikozydowo należy przeprowadzić hydrolizę kwasową, natomiast kwasy fenolowe związane estrowo uwalniane są w wyniku hydrolizy zasadowej. Trzecią mniej popularną procedurą jest uwalnianie kwasów fenolowych przy użyciu odpowiednich enzymów (esterazy i glikozydazy) [41,42,43].

Chociaż w literaturze czas reakcji i temperatura w opisanych procedurach hydrolizy kwasowej bardzo się różnią, to główna metoda obejmuje traktowanie wyciągów roślinnych kwasem nieorganicznym (HCl) w temperaturze wrzenia lub powyżej temperatury wrzenia pod chłodnicą zwrotną w rozpuszczalniku wodnym lub alkoholowym (najczęściej stosowany jest metanol, stężenie wodnego roztworu kwasu solnego wynosiło od 1 do 2 mol/dm³, a czas reakcji mieścił się w zakresie od 30 minut do 1 godziny).

W pracy Gao i in. przeprowadzono serię badań w celu znalezienia optymalnych warunków ekstrakcji i maksymalnej ochrony kwasów fenolowych podczas hydrolizy w środowisku kwaśnym. Hydroliza w mieszaninie 2-molowego kwasu solnego i metanolu w stosunku objętościowym 1 : 1 w temperaturze 100°C przez 1 godzinę wykazała największą wartość odzysków (30%-65%). Monitorowano zarówno estry metylowe, jak również kwasy karboksylowe. Rozpuszczalniki takie, jak etanol, alkohol *tert*-butylowy oraz 2-propanol dają gorsze rezultaty, a z kolei wodny roztwór kwasu solnego niszczy kwasy hydroksycynamonowe. Hollman i Venema przeprowadzili ekstrakcję i hydrolizę kwasową kwasu elagowego z orzechów włoskich i jagód (truskawki, jeżyny i maliny) stosując różne stężenia kwasu solnego i wodnego roztworu metanolu wraz ze zmianą czasu prowadzenia hydrolizy. Dla elagotanin z orzechów włoskich optymalne warunki prowadzenia hydrolizy kwasowej to zastosowanie 5-molowego roztworu kwasu solnego w 57% wodnym roztworze metanolu w czasie 1 godziny. Z kolei w przypadku truskawek, jeżyn i malin optymalne warunki prowadzenia hydrolizy kwasowej to zastosowanie 3,5-molowego roztworu kwasu solnego w 72% wodnym roztworze metanolu w czasie 4-8 godziny [28,44]. Krygier i in. donoszą, że straty kwasów fenolowych w warunkach hydrolizy kwasowej wynoszą od 15% dla kwasu *o*-kumarowego do 95% dla kwasu synapinowego [28]. Hydroliza zasadowa (zmydlanie) obejmuje obróbkę próbki roztworem wodorotlenku sodu w zakresie stężeń od 1 do 4 mol/dm³. Większość tych reakcji przeprowadza się w temperaturze pokojowej w czasie od 15 minut do 12 godzin, chociaż Shahrzad i in. przeprowadzili hydrolizę soku winogronowego przy użyciu 1,5-molowego roztworu wodorotlenku sodu w czasie 62 godzin. W niektórych badaniach wspomniano, że reakcje prowadzi się w ciemności, a także, w obojętnej atmosferze takiej, jak azot [28]. Niewielkie modyfikacje tej typowej metody hydrolizy to stale mieszanie przez 24 godziny w temperaturze 37°C. W najnowszych badaniach hydrolizę zasadową prowadzono stosując borowodorek sodu i wodorotlenek baru w ciągu 15 minut w temperaturze 100°C. Lam i in. przeprowadzili hydrolizę zasadową w trudnych warunkach i dla porównania przeprowadzili zmydlanie 4-molowym roztworem wodorotlenku sodu przez 2 godziny w temperaturze 170°C. W innych badaniach reakcję hydrolizy zasadowej przeprowadzono w ciemności, w warunkach beztlenowych uzyskanych poprzez przedmuchiwanie azotem [28].

Krygier i in. poinformował, że hydroliza alkaliczna może prowadzić do znacznych strat niektórych pochodnych kwasu hydroksycynamonowego, ale można temu zapobiec przez dodanie 1% kwasu askorbinowego i 10 mmoli EDTA [29,37].

Rommel i Wrolsta przeprowadzali zarówno hydrolizę kwasową (kwas solny), jak również hydrolizę zasadową (wodorotlenek sodu) podczas badania zawartości kwasów fenolowych (np. kwasu elagowego, hydroksybenzoesowego i hydroksycynamonowego) w soku z malin. Skład próbki zawierającej fenolokwasy

uwolnione w wyniku hydrolizy zasadowej był bardzo podobny do składu tej samej próbki, lecz poddanej hydrolizie kwasowej. Tylko jeden związek tj. kwas elagowy skuteczniej hydrolizuje w warunkach alkalicznych, niż w kwaśnych [44]. Seo i Morr stwierdzili, że hydroliza zasadowa z użyciem wodorotlenku sodu prowadzi do lepszych odzysków kwasu ferulowego z produktów białkowych soi, niż hydroliza kwasowa z użyciem kwasu solnego [44].

Ekstrakcja ciecz-ciecz jest dobrze znaną procedurą stosowaną w celu oczyszczania frakcji kwasów fenolowych. Wszystkie ekstrakty (uzyskane podczas różnych metod ekstrakcji) odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i następnie oczyszczano metodą ekstrakcji ciecz-ciecz. Suche pozostałości wymywano gorącą wodą, chłodzono w lodówce przez 12 lub 24 godziny, a następnie filtrowano. Osad przemywano wodą destylowaną, a przesącz odfuszczano podczas dwukrotnej ekstrakcji eterem naftowym. Wodny roztwór (I), ekstrahowano eterem dietylowym. Kwasy fenolowe zawarte w frakcji eterowej ekstrahowano 5% roztworem wodorowęglanu sodu, w celu przekształcenia kwasów fenolowych w sole rozpuszczalne w wodzie. Warstwę wodno-wodorowęglanową zakwaszono 36% roztworem kwasu solnego do pH = 3 w celu uwolnienia kwasów fenolowych, a następnie poddano ekstrakcji eterem dietylowym. Ekstrakty eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. W ten sposób wyodrębniono frakcję wolnych kwasów fenolowych [35,41,42].

Pierwszą część roztworu wodnego (I) poddano hydrolizie kwasowej w celu uwolnienia kwasów fenolowych związanych glikozydowo. Wyciąg wodny zakwaszono 36% kwasem solnym do pH = 2 i całość ogrzewano przez 1 godzinę w temperaturze 60°C. Hydrolizat ostudzono i ekstrahowano eterem dietylowym. Warstwy eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a następnie przesączono. Rozpuszczalnik oddestylowano otrzymując w ten sposób frakcję kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej. Drugą część roztworu wodnego (I) poddano hydrolizie zasadowej w celu uwolnienia kwasów fenolowych związanych estrowo. Do wyciągu wodnego dodano 1 g borowodoru sodu oraz 10% wodnego roztworu wodorotlenku baru do pH = 12 i całość ogrzewano przez 15 minut w temperaturze 60°C. Hydrolizat ostudzono, a następnie zakwaszono roztworem kwasu siarkowego(VI), do pH = 2 i ekstrahowano eterem dietylowym. Połączone warstwy eterowe suszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a następnie przesączono. Rozpuszczalnik oddestylowano i w ten sposób wyodrębniono frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej [35,41,42,45].

W niniejszym podrozdziale przedstawiono przegląd najczęściej stosowanych metod ekstrahowania związków fenolowych z bardzo różnorodnego materiału roślinnego. Metody te obejmują ekstrakcję w aparacie Soxhleta, ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami, ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym oraz ekstrakcję pod zwiększonym ciśnieniem. Nasuwa się ogólny wniosek, iż ze względu na bardzo zróżnicowaną morfologię oraz skład chemiczny materiałów botanicznych dla każdej badanej rośliny należałoby na wstępie przeprowadzić optymalizację procesu ekstrakcji.

4. Chemotaksonomia roślin i jej znaczenie dla nowoczesnej systematyki roślin

Chemotaksonomia to gałąź taksonomii zajmująca się podziałem organizmów roślinnych i zwierzęcych według zawartych w nich charakterystycznych substancji chemicznych, w celu ulepszenia systematyki tych organizmów. Najbardziej użyteczna

w tej kwestii jest analiza metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz nośników informacji genetycznej (kwasów nukleinowych i białek). Analizy na podstawie których można wytypować tzw. markery chemotaksonomiczne (czyli substancje występujące np. dla danego rodzaju roślin) lub też pomocnicze wskaźniki chemotaksonomiczne (czyli substancje występujące dla określonego gatunku roślin) stanowią podstawę do systematyki roślin ze względu na ich skład chemiczny. Systematyka zaproponowana w XVIII wieku przez Karola Linneusza opierała się wyłącznie na prostym podobieństwie morfologicznym i cytologicznym. O tym, że niektóre rośliny odznaczają się pewnymi właściwościami farmakologicznymi, wiadano już od dawna, jednak dopiero od niedawna zaczęto odkrywać i poznawać substancje czynne, które są za nie odpowiedzialne. Chemotaksonomia rozwija się od lat 60. XX wieku i jako stosunkowo młoda dziedzina nauki ma przed sobą jeszcze wiele do odkrycia. Obecnie zakres informacji na temat substancji biologicznie czynnych zawartych w roślinach ogromnie się pogłębił, a ciągłe udoskonalanie narzędzi analitycznych, jakimi posługuje się nowoczesna chemia umożliwiły lepszy wgląd w skład chemiczny roślin [25,26].

III. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było:

- 1) Porównanie wydajności różnych technik i wariantów ekstrakcji związków o charakterze polarnym dla roślin należących do rodzaju *Salvia* na przykładzie gatunku szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis*);
- 2) Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej oraz specjalnych technik rozwijania chromatogramów celem porównywania „odcisków palca” (czyli tzw. fingerprintów) frakcji o różnych polarnościach dla badanych gatunków szalwii pochodzących z tego samego okresu wegetacyjnego;
- 3) Porównanie fingerprintów frakcji polarnej dla różnych gatunków szalwii uzyskanych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją DAD i ELSD (HPLC-DAD i HPLC-ELSD);
- 4) Częściowa identyfikacja związków fenolowych zawartych w badanych gatunkach szalwii techniką TLC i HPLC oraz wytypowanie wśród nich markerów chemotaksonomicznych oraz chemotaksonomicznych wskaźników pomocniczych;
- 5) Spektrofotometryczne oznaczanie sumarycznej zawartości związków fenolowych w badanych gatunkach szalwii wraz z porównaniem międzygatunkowym i sezonowym;
- 6) Chemometryczne porównanie fingerprintów badanych gatunków szalwii (*Salvia* L.) pochodzących z tej samej plantacji, z tego samego i różnych sezonów wegetacyjnych pod kątem ich zróżnicowania sezonowego i gatunkowego.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura i odczynniki

Podczas przygotowywania i analizy materiału roślinnego został wykorzystany następujący sprzęt laboratoryjny:

- Pipety automatyczne firmy Socorex (Ecublens, Szwajcaria);
- Filtry strzykawkowe Anotop firmy Merck (Darmstadt, Niemcy);
- Komory chromatograficzne DS typu sandwich firmy Chromdes (Lublin);
- Komory chromatograficzne pionowe firmy Merck (Darmstadt, Niemcy);
- Płaszcz grzewczy z regulacją mocy SXXW – 981B firmy ChemLand (Stargard Szczeciński);
- Mieszadło magnetyczne z funkcją grzania RCT basic IKAMAG firmy IKA (Staufen, Niemcy);
- Waga laboratoryjna WXD 200/2000 firmy RADWAG (Radom);
- Spektrofotometr Genesis 6 firmy ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, USA);
- pHmetr Orion 4 – Star Plus (Nijkerk, Holandia);
- Zestaw do oczyszczania wody Elix Advantage 3 System firmy Millipore (Billerica, Massachusetts, USA);
- Rotacyjna wyparka próżniowa RV 10 digital VC firmy IKA (Staufen, Niemcy);
- Młynek elektryczny MSM6260 400W firmy Bosch (Stuttgart, Niemcy);
- Łaźnia ultradźwiękowa Bandelin Sonorex Super RK 255H (Berlin, Niemcy);
- Wideoskaner Chromimage AR2i (Le Plessis Robinson, Francja);
- Lampa UV firmy Camag (Muttens, Szwajcaria);
- Aplikator do TLC AS-30 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy);
- Densytometr skaningowy model CD 60 firmy Desaga (Heidelberg, Niemcy);
- Ciśnieniowy ekstraktor cieczowy ASE 200 firmy Dionex (Sunnyvale, Kalifornia, USA);
- Kolumna chromatograficzna firmy Varian, typu Pursuit C₁₈ o wymiarach 250 mm × 4,6 mm; grubość ziarna 5 µm (Harbor City, Kalifornia, USA);
- Kolumna chromatograficzna firmy Varian, typu Pursuit XR_S-C₁₈ o wymiarach 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 µm (Harbor City, Kalifornia, USA);
- Chromatograf cieczowy Gynkotek P 580A LPG wyposażony w autosampler Gyncotek Gina 50, pompę Gyncotek P 580A LPG oraz detektor fotodiodowy DAD UVD 340U (Macclesfield, Anglia);
- Chromatograf cieczowy Varian 920-LC wyposażony w autosampler 900-LC, pompę gradientową, detektor fotodiodowy 330 DAD oraz fotodyspersyjny detektor laserowy (ELSD) Varian 385 LC (Santa Clara, Kalifornia, USA).

W niniejszej pracy wykorzystano płytki chromatograficzne firmy Merck:

- TLC 10 cm × 20 cm SiO₂ 60 F₂₅₄ (Nr. kat. 1.05729)
- PLC 20 cm × 20 cm SiO₂ 60 F₂₅₄ (Nr. kat. 1.05717)
- HPTLC 10 cm × 10 cm oraz 10 cm × 20 cm SiO₂ 60 F₂₅₄ (Nr. kat. 1.05628; 1.05642)
- HPTLC 20 cm × 20 cm NH₂ F₂₅₄S (Nr. kat. 1.13192)
- HPTLC 10 cm × 10 cm DIOL F₂₅₄S (Nr. kat. 1.12668)
- HPTLC 10 cm × 10 cm CN F₂₅₄S (Nr. kat. 1.16464)
- Celuloza 10 cm × 20 cm (Nr. kat. 1.05730)

Rozpuszczalniki użyte podczas analiz:

Aceton, acetonitryl, acetyloaceton, benzen, n-butanol, 2-butanon, chloroform, 1,4-dioksan, etanol, eter dietylowy, eter diizopropylowy, eter naftowy, n-heksan, n-heptan, metanol, octan etylu, 2-propanol, toluen.

Odczynniki użyte podczas analiz:

Azotan(III) sodu, borowodorek sodu, chlorek glinu, kwas mrówkowy, kwas octowy, kwas solny, kwas siarkowy(VI), molibdenian sodu, siarczan(VI) sodu, węglan sodu, wodorotlenek baru, wodorotlenek sodu, wodorowęglan sodu.

Wszystkie wyżej wymienione rozpuszczalniki i odczynniki chemiczne charakteryzowały się stopniem czystości do analizy i pochodziły z firmy PPH POCH, Gliwice.

Do analiz używano wody redestylowanej otrzymanej w laboratorium Uniwersytetu Śląskiego.

Metenamina pochodziła z firmy Pharma Cosmetics (Kraków);
Glikol polietylenowy 4000 i boran 2-aminoetylodifenyłowy pochodziły z firmy Merck
Wanilina i stabilny rodnik DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) pochodziły z firmy Aldrich.

W tabeli 1 przedstawiono wykaz substancji wzorcowych użytych w badaniach.

Tab. 1. Wykaz substancji wzorcowych zastosowanych w niniejszej pracy

Nazwa substancji wzorcowej	Producent
Kwas chlorogenowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA), Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas elagowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas ferulowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)
Kwas galusowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas gentyzynowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas <i>m</i> -hydroksybenzoesowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas <i>p</i> -hydroksybenzoesowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas kawowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)
Kwas <i>o</i> -kumarowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas <i>m</i> -kumarowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas <i>trans-p</i> -kumarowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)
Kwas protokatechowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)
Kwas rozmarynowy	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)
Kwas syringowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas synapinowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas izowanilinowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwas wanilinowy	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Akacetyna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Apigenina	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Eskuletyna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Herniaryna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hesperetyna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hiperozyd	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kemferol	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwercetyna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kwercytryna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Izokwercytryna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kumaryna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
7-Hydroksykumaryna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Luteolina	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA), Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Miryctetyna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Naringenina	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rutyna	ChromaDex (Santa Ana, CA, USA), Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Skopoletyna	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glukozyd apigeniny	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glukozyd hesperetyny	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glukozyd kemferolu	Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glukozyd luteoliny	Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2. Metodyka prowadzenia badań

2.1. Materiał roślinny

Materiał roślinny do badań stanowiło 26 gatunków roślin z rodzaju *Salvia* (Tab. 2.), pochodzących z uprawy w Ogrodzie Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz dwa gatunki pozyskane ze stanowisk naturalnych, (*S. glutinosa* z Ostrowska, Polska i *S. officinalis* z Zlatiboru, Serbia). Materiał roślinny, jaki posłużył do przeprowadzenia prezentowanych badań zebrano w latach 2007-2009. Zioła badanych gatunków szalwii pochodzące z uprawy w Lublinie suszono w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 35-40°C przez 40 godzin. Wszystkie badane gatunki w postaci suszu rozdrabniano w młynku elektrycznym. Tak przygotowany materiał roślinny poddawano analizie.

Tab. 2. Wykaz gatunków szalwii poddanych analizie oraz ich okresy wegetacyjne.

Nr	Gatunek szalwii	Rok zbioru	Nr	Gatunek szalwii	Rok zbioru
1	<i>S. amplexicaulis</i>	2007, 2008, 2009	15	<i>S. triloba</i>	2007, 2008, 2009
2	<i>S. azurea</i>	2007, 2008, 2009	16	<i>S. verticillata</i>	2007, 2008, 2009
3	<i>S. cadmica</i>	2007, 2008, 2009	17	<i>S. officinalis</i>	2007, 2008, 2009
4	<i>S. deserta</i>	2007, 2008, 2009	18	<i>S. lavandulifolia</i>	2007, 2009
5	<i>S. forskahlei</i>	2007, 2008, 2009	19	<i>S. atropatana</i>	2007
6	<i>S. glutinosa</i> ^a	2007, 2008, 2009	20	<i>S. canariensis</i>	2007
7	<i>S. hians</i>	2007, 2008, 2009	21	<i>S. argentea</i>	2008, 2009
8	<i>S. jurisicii</i>	2007, 2008, 2009	22	<i>S. austriaca</i>	2008, 2009
9	<i>S. nemorosa</i>	2007, 2008, 2009	23	<i>S. nutans</i>	2008, 2009
10	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	2007, 2008, 2009	24	<i>S. regeliana</i>	2008, 2009
11	<i>S. sclarea</i>	2007, 2008, 2009	25	<i>S. superba</i>	2008, 2009
12	<i>S. staminea</i>	2007, 2008, 2009	26	<i>S. glutinosa</i>	2008
13	<i>S. stepposa</i>	2007, 2008, 2009	27	<i>S. officinalis</i> ^b	2008
14	<i>S. tesquicola</i>	2007, 2008, 2009	28	<i>S. pratensis</i>	2009

^aze stanowiska naturalnego w Ostrowsku, Polska

^bze stanowiska naturalnego w Zlatiborze, Serbia

2.2. Zastosowane metody ekstrakcji związków fenolowych

2.2.1. Ekstrakcja tradycyjna [46-49]

W kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczono 10 g odważonego materiału roślinnego, który dwukrotnie ekstrahowano n-heksanem przez 24 godziny w standardowych warunkach, odpowiednio porcjami 200 ml i 100 ml. Otrzymane ekstrakty heksanowe odrzucono. Następnie odsączony i wysuszony surowiec poddano ekstrakcji chloroformem (100 ml) w temperaturze pokojowej (około 22°C) przez 24 godziny. Po tym czasie materiał roślinny odsączono, a otrzymany ekstrakt odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w 10 ml metanolu, a następnie przefiltrowano przez filtr strzykawkowy. Ekstrakcję przeprowadzono trzykrotnie.

Ekstrakcji poddano jeden gatunek szalwii, a mianowicie *S. officinalis*.

2.2.2. Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE) z wykorzystaniem różnych ekstrahentów [50-53]

Odważono porcję 5 g materiału roślinnego, którą następnie umieszczono w metalowej celce i ekstrahowano w ciśnieniowym ekstraktorze cieczowym ASE 200. Ekstrakcję przeprowadzono według trzech odrębnych procedur, których warunki oraz poszczególne etapy przedstawiono w tabeli 3. Każdą z procedur ekstrakcji wykonano trzy razy.

W pierwszym przypadku jako ekstrahentów użyto n-heksanu oraz metanolu. Wstępnie przeprowadzono jednokrotną ekstrakcję materiału roślinnego n-heksanem w celu eliminacji chlorofilu i mniej polarnych substancji, a otrzymany ekstrakt odrzucono. Następnie materiał roślinny poddano jednokrotnej ekstrakcji metanolem. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w 5 ml metanolu. Całość utrzymywano na łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie metanolowy ekstrakt zatężono do objętości 1 ml i przesączono przez filtr strzykawkowy.

W drugim przypadku przeprowadzono jednokrotną ekstrakcję materiału roślinnego, a jako rozpuszczalnika użyto metanolu. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w 5 ml metanolu. Całość utrzymywano na łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie metanolowy ekstrakt zatężono do objętości 1 ml i przesączono przez filtr strzykawkowy.

W trzecim i zarazem ostatnim przypadku przeprowadzono jednokrotną ekstrakcję materiału roślinnego, a jako rozpuszczalnika użyto mieszaniny metanolu i wody w stosunku objętościowym 8 : 2. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w 5 ml metanolu. Całość utrzymywano na łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie metanolowy ekstrakt zatężono do objętości 1 ml i przesączono przez filtr strzykawkowy.

W pierwszym etapie badań, które miały na celu dobór warunków ekstrakcji, procesowi temu poddano jedynie gatunek *S. officinalis*. Po dokonaniu wyboru najefektywniejszej z metod ekstrakcji (tj. z wykorzystaniem jako ekstrahentów n-heksanu i metanolu), ekstrakcji poddano gatunki szalwii zebrane w latach 2007 i 2008.

2.2.3. Selektywna ekstrakcja kwasów fenolowych [54]

Podstawowy ekstrakt do analizy przygotowano w następujący sposób: odważono 10 g bardzo drobno rozdrobnionego materiału roślinnego, próbkę umieszczono w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i trzykrotnie ekstrahowano na łaźni wodnej przez 30 minut, każdorazowo używając 50 ml metanolu. Otrzymane wyciągi metanolowe połączono, a następnie odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej, nie przekraczając temperatury 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 20 ml gorącej wody i pozostawiono w lodówce na 24 godziny. Następnie powstały osad odsączono, a roztwór przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą do kreski. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie.

Ekstrakcji poddano 26 gatunków szalwii zebranych w latach od 2007 do 2009.

Tab. 3. Warunki prowadzenia ciśnieniowej ekstrakcji cieczonej z wykorzystaniem różnych ekstrahentów

Nr	Rozpuszczalnik	Masa materiału roślinnego [g]	Czas wstępnego ogrzewania próbki [min]	Czas ogrzewania próbki po dodaniu rozzpuszczalnika [min]	Czas ekstrakcji statycznej [min]	Ciśnienie [atm]	Temperatura [°C]	Liczba cykli	Całkowity czas ekstrakcji [min]	Całkowita objętość rozzpuszczalnika [ml]
1	n-heksan* (jeden cykl) metanol (jeden cykl)	5	10	5	5	65	40	1	32	40 + 40
		5	2	5	5	68	100	1		
2	metanol	5	2	5	5	68	100	1	12	40
3	metanol : woda, 8:2 (v/v)	5	10	5	5	65	40	1	20	40

*Ekstrakty heksanowe odrzucano.

2.2.4. Selektywna ekstrakcja flawonoidów [54]

Podstawowy ekstrakt przygotowano poprzez odważenie 1 g średnio sproszkowanego materiału roślinnego, który umieszczono w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną. Dodano 20 ml acetonu, 2 ml roztworu kwasu solnego o stężeniu 281 g/l oraz 1 ml metenaminy o stężeniu 5 g/l. Całość utrzymywano we wrzeniu na łaźni wodnej przez okres 30 minut. Otrzymany w ten sposób hydrolizat przesączono przez watę do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Watę wraz z osadem ponownie umieszczono w kolbie okrągłodennej i dwukrotnie ekstrahowano na łaźni wodnej przez 10 minut, każdorazowo używając 20 ml acetonu. Otrzymane wyciągi acetonowe połączono, umieszczono w kolbie miarowej i uzupełniono acetonem do 100 ml. Otrzymany roztwór poddano ekstrakcji typu ciecz-ciecz. W tym celu 20 ml wyciągu acetonowego umieszczono w rozdzielaczu, dodano 20 ml wody i ekstrahowano czterema porcjami octanu etylu, pierwszą o objętości 15 ml i następnie trzema o objętościach po 10 ml. Połączone warstwy octanu etylu przemyto dwiema porcjami po 40 ml wody, przesączono do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełniono octanem etylu do kreski. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie.

Ekstrakcji poddano 26 gatunków szalwii zebranych w latach od 2007 do 2009.

2.2.5. Wielostopniowa ekstrakcja związków fenolowych [55-58]

Izolację związków fenolowych z 10 wybranych gatunków szalwii (*S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. verticillata*, *S. azurea*, *S. cadmica*, *S. pratensis ssp. Haematodes*, *S. glutinosa* i *S. triloba* zebranych w 2009 roku i wyselekcjonowanych na podstawie wyników analizy spektrofotometrycznej) przeprowadzono z wykorzystaniem ekstrakcji typu ciało stałe – ciecz w aparacie Soxhleta, a następnie wykorzystano ekstrakcję typu ciecz – ciecz. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie.

Porcję zawierającą 25 g rozdrobnionego materiału roślinnego umieszczono w gilzie z bibuły filtracyjnej, a następnie w aparacie Soxhleta. Surowiec ten poddano 24-godzinnej maceracji, a następnie wyczerpującej ekstrakcji eterem naftowym w celu odtłuszczenia materiału roślinnego. Wyciąg eterowy odrzucono, a następnie po wysuszeniu gilzy z surowcem w temperaturze pokojowej, przeprowadzono kolejną 24-godzinną macerację i wyczerpującą ekstrakcję metanolem w aparacie Soxhleta. Ekstrakt metanolowy odparowano w rotacyjnej wyparce próżniowej, nie przekraczając temperatury 50°C. Suchą pozostałość przemyto czterema porcjami gorącej wody po 25 ml każda i pozostawiono w lodówce na okres 24 godzin. Następnie w celu pozbycia się osadu, roztwór wodny (RW) przesączono i ekstrahowano porcjami po 20 ml eteru dietylowego, aż do zaniku zabarwienia warstwy organicznej. Otrzymaną frakcję eterową (FE) ekstrahowano porcjami po 10 ml 5% roztworu wodorowęglanu sodu, aż do zaniku zabarwienia warstwy wodnej. Pozostałą frakcję eterową (FE) poddano ekstrakcji porcjami po 10 ml 5% roztworu węglanu sodu, również do zaniku zabarwienia warstwy wodnej.

Warstwę wodno - wodorowęglanową zakwaszono 18% roztworem kwasu solnego do pH \approx 3 w celu uwolnienia kwasów fenolowych, a następnie poddano ekstrakcji porcjami po 20 ml eteru dietylowego, aż do odbarwienia warstwy organicznej. Ekstrakty eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml. W ten sposób wyodrębniono **frakcję wolnych kwasów fenolowych (WKF)**.

Warstwę wodno - węglanową zakwaszono 18% roztworem kwasu solnego do $\text{pH} \approx 2$, a następnie poddano ekstrakcji porcjami po 20 ml eteru dietylowego, aż do odbarwienia warstwy organicznej. Ekstrakty eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml. W ten sposób wyodrębniono **frakcję aglikonów flawonoidowych (AF)**.

Roztwór wodny (RW) poddano ekstrakcji porcjami po 20 ml octanu etylu, aż do jego odbarwienia. Ekstrakty octanowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml. W ten sposób wyodrębniono **frakcję niepolarnych glikozydów flawonoidowych (GFO)**.

Następnie roztwór wodny (RW) ekstrahowano porcjami po 20 ml n-butanolu, aż do jego odbarwienia. Ekstrakty butanolowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, przesączono i odparowano do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml. W ten sposób wyodrębniono **frakcję polarnych glikozydów flawonoidowych (GFB)**. Opisaną powyżej procedurę przedstawiono schematem na rysunku 62a.

Pozostały roztwór wodny (RW) podzielono na dwie równe części, z których jedną poddano hydrolizie kwasowej, a drugą hydrolizie zasadowej.

Pierwszą część roztworu wodnego (RW) poddano hydrolizie kwasowej w celu uwolnienia kwasów fenolowych związanych glikozydowo. Wyciąg wodny zakwaszono 36% kwasem solnym do $\text{pH} \approx 2$ i całość ogrzewano na łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Hydrolizat ostudzono, przesączono, a przesącz ekstrahowano porcjami po 20 ml eteru dietylowego do jego odbarwienia. Warstwy eterowe połączono, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a następnie przesączono. Rozpuszczalnik oddestylowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml, otrzymując w ten sposób **frakcję kwasów fenolowych, uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej (KKF)**.

Drugą część roztworu wodnego (RW) poddano hydrolizie zasadowej w celu uwolnienia kwasów fenolowych związanych estrowo. Do wyciągu wodnego dodano 1 g borowodorku sodu, by ochronić kwasy fenolowe przed utlenieniem. Następnie roztwór zalkalizowano dodając 10% wodnego roztworu wodorotlenku baru do $\text{pH} \approx 12$ i całość utrzymywano w stanie wrzenia na łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę. Hydrolizat ostudzono, zobojętniono 10% wodnym roztworem kwasu siarkowego(VI), a następnie zakwaszono stężonym kwasem siarkowym(VI) do $\text{pH} \approx 1,5$. Wytrącony osad siarczanu(VI) baru odsączono, a przesącz ekstrahowano porcjami po 20 ml eteru dietylowego do jego odbarwienia. Połączone warstwy eterowe suszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a następnie przesączono. Rozpuszczalnik oddestylowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 10 ml. W ten sposób wyodrębniono **frakcję kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej (ZKF)**. Opisaną powyżej procedurę hydrolizy przedstawiono schematycznie na rysunku 62b. Dokładne ilości ekstrahentów użytych podczas wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych zamieszczono w tabeli 4.

Tab. 4. Ilość porcji ekstrahentów użytych podczas wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych wybranych gatunków szalwii

Gatunek szalwii	Ilość porcji eteru dietylowego (20 ml) do ekstrakcji roztworu wodnego (RW)	Ilość porcji 5% roztworu wodorowęglanu sodu (10 ml) do ekstrakcji frakcji eterowej (FE)	Ilość porcji eteru dietylowego (20 ml) do ekstrakcji warstwy wodno – wodorowęglanowej	Ilość porcji 5% roztworu węglanu sodu (10 ml) do ekstrakcji frakcji eterowej (FE)	Ilość porcji eteru dietylowego (20 ml) do ekstrakcji warstwy wodno - węglanowej	Ilość porcji octanu etylu (20 ml) do ekstrakcji roztworu wodnego (RW)	Ilość porcji n-butanolu (20 ml) do ekstrakcji roztworu wodnego (RW)	Ilość porcji eteru dietylowego (20 ml) do ekstrakcji hydrolizatu (hydroliza kwasowa)	Ilość porcji eteru dietylowego (20 ml) do ekstrakcji hydrolizatu (hydroliza zasadowa)
<i>S. officinalis</i>	9	20	10	16	6	12	10	6	10
	10	19	9	16	6	13	10	6	12
	9	26	8	20	8	12	12	6	7
<i>S. sclarea</i>	8	22	7	20	8	11	12	5	6
	11	20	10	20	12	12	18	5	6
	10	18	9	19	12	11	15	5	6
<i>S. staminea</i>	11	24	15	16	6	10	15	10	10
	11	22	13	15	6	9	15	10	10
	15	24	12	24	8	13	12	8	10
<i>S. verticillata</i>	14	22	11	23	7	12	12	8	9
	8	17	10	19	6	10	9	7	6
	9	18	10	21	8	11	10	8	6
<i>S. azurea</i>	11	18	10	16	6	9	8	5	5
	11	14	11	18	7	7	6	5	5
	10	20	15	24	6	11	15	8	5
<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	10	19	15	24	7	10	14	7	5
	10	24	8	20	7	11	10	7	6
	13	20	6	18	6	10	10	6	6
<i>S. glutinosa</i>	8	16	7	12	5	11	6	5	5
	8	15	6	12	5	10	6	5	5
	8	15	6	12	5	10	6	5	5

2.3. Analiza ekstraktów roślinnych techniką chromatografii cienkowarstwowej

2.3.1. Układy chromatograficzne zastosowane do optymalizacji rozdzielania ekstraktów *szałwii lekarskiej* (*S. officinalis*) uzyskanych metodą tradycyjną oraz metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczerwowej

W pierwszym etapie badań eksperyment chromatograficzny przeprowadzono zarówno w normalnym, jak i w odwróconym układzie faz z zastosowaniem jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej dla ekstraktów otrzymanych według procedur opisanych w podrozdziałach 2.2.1 i 2.2.2., w celu porównania wydajności zastosowanych metod ekstrakcji.

Przed użyciem płytki pokryte żelem krzemionkowym aktywowano przez 15 minut w temperaturze 110°C. Próbkę o objętości 5 µl nanoszono punktowo przy pomocy automatycznego aplikatora. Wszystkie chromatogramy rozwijano w komorach pionowych, które wcześniej wysycano przez 15 minut parami fazy ruchomej. Chromatogramy rozwijano na wysokość 15 cm, po czym suszono je w warunkach pokojowych przez 3 godziny. Po wysuszeniu każdy chromatogram skanowano z zastosowaniem wideoskanera, przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm. Do analizy chromatogramów użyto także densytometru skanującego. Densytogramy rejestrowano przy długości fali $\lambda = 340$ nm.

W celu porównania wydajności metod ekstrakcji i wyboru najefektywniejszej z nich zastosowano przedstawione w tabeli 5 układy chromatograficzne.

Tab. 5. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy techniką chromatografii cienkowarstwowej ekstraktów *szałwii lekarskiej* (*S. officinalis*)

Faza Stacjonarna	Faza Ruchoma
RP-18	benzen + kwas octowy + woda 12 : 14 : 6 (v/v) [59]
RP-18	metanol + woda + kwas octowy 78 : 25 : 3 (v/v) [60] 25 : 25 : 3 (v/v) [60]
RP-18	woda + metanol 6 : 4 (v/v) [61]
SiO ₂	2-propanol + octan etylu 1 : 1 (v/v) [62]
SiO ₂	octan etylu + n-heptan + kwas octowy 6 : 4 : 0,1 (v/v) [63]
SiO ₂	toluen + 1,4-dioksan + kwas mrówkowy 7 : 2 : 1 (v/v) [61]
SiO ₂	toluen + 1,4-dioksan 7 : 2 (v/v)
SiO ₂	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy 4 : 4 : 1 (v/v) [60] 5 : 4 : 1 (v/v) [64, 65]

Za najlepszą fazę stacjonarną uznano żel krzemionkowy, zaś mieszaninę toluenu i 1,4-dioksanu w stosunku objętościowym 7 : 2 za najlepszy eluent.

2.3.2. Warunki chromatografowania ekstraktu szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) uzyskanego metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej techniką chromatografii preparatywnej (PLC)

Przeprowadzono rozdział składników metanolowego ekstraktu uzyskanego metodą ASE (1) techniką preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PLC), stosując analogiczne warunki prowadzenia rozdziału, jak w przypadku analitycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Również w tym przypadku jako fazę stacjonarną użyto żel krzemionkowy, a jako fazę ruchomą mieszaninę toluenu i 1,4-dioksanu w stosunku objętościowym 7 : 2. Próbkę o objętości 40 µl nanoszono pasmem o długości 16 cm przy pomocy automatycznego aplikatora. Chromatogram rozwijano w komorze pionowej, którą wcześniej wysycano przez 15 minut parami fazy ruchomej. Chromatogram rozwijano na wysokość 15 cm, po czym suszono go w warunkach pokojowych przez 3 godziny. Po wysuszeniu chromatogram skanowano z zastosowaniem wideoskanera, przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm. Każdą z pięciu rozdzielonych frakcji starannie zdrapano, umieszczono w fiolkach i dodano po 20 ml metanolu. Całość utrzymywano na łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie metanolowy roztwór przesączono przez filtr strzykawkowy w celu oddzielenia żelu krzemionkowego. Uzyskany przesącz odparowano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczono w 1 ml metanolu i ponownie przesączono przez filtr strzykawkowy. Po wyodrębnieniu frakcje poddano dalszej analizie techniką HPLC/DAD. Warunki przeprowadzonej analizy są analogiczne, jak w przypadku analizy mającej na celu porównanie metod ekstrakcji. Mianowicie, wykorzystano elucję izokratyczną w układzie acetonitryl : woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego w stosunku objętościowym 55 : 45. Badania przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego firmy GyncoTek, wyposażonego w autosampler, detektor fotodiodowy DAD oraz kolumnę chromatograficzną C₁₈ firmy Varian o wymiarach 250 mm × 4.6 mm i średnicy ziarna 5 µm. Podczas analizy wykorzystano oprogramowanie Chromeleon Dionex v. 6.4. Próbkę dozowano w ilości 40 µl. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,6 ml/min, a czas analizy wynosił 80 minut. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali świetlnej $\lambda = 225$ nm.

2.3.3. Układy chromatograficzne zastosowane do rozdziału ekstraktów dwudziestu gatunków szalwii uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej

W drugim etapie analizie poddano ekstrakty 20 gatunków szalwii zebranych w 2007 i 2008 roku z zastosowaniem techniki jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej. Celem tej analizy była konstrukcja charakterystycznych odcisków palca, czyli fingerprintów uzyskanych ekstraktów.

W eksperymencie użyto płytek szklanych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego. Przed użyciem płytki aktywowano przez 15 minut w temperaturze 110°C. Otrzymane ekstrakty nanoszono przy pomocy aplikatora, a objętość próbki każdorazowo wynosiła 10 µl. Wszystkie chromatogramy rozwijano w poziomych komorach typu sandwich, które wcześniej wysycano przez 15 minut parami fazy ruchomej. Po rozwinięciu chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Zastosowane odczynniki wywołujące podano przy omówieniu wyników. Zastosowane układy chromatograficzne zestawiono w tabeli 6.

Tab. 6. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy techniką chromatografii cienkowarstwowej ekstraktów 20 gatunków szalwii zebranych w 2007 i 2008 roku

Faza Stacjonarna	Faza Ruchoma
SiO ₂	toluen + octan etylu 95 : 5 (v/v) [66] 5 : 95 (v/v) 15 : 85 (v/v)
SiO ₂	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy 70 : 30 : 1 (v/v) [67] 30 : 70 : 1 (v/v)
SiO ₂	toluen + 1,4-dioksan 7 : 2 (v/v)

Następnie przeprowadzono eksperyment mający na celu konstrukcję tzw. podwójnych fingerprintów oraz częściową identyfikację składników badanych ekstraktów szalwii.

W eksperymencie użyto płytek szklanych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego. Przed użyciem płytki aktywowano przez 15 minut w temperaturze 110°C. Otrzymane ekstrakty nanoszono przy pomocy aplikatora, a objętość próbki każdorazowo wynosiła 10 µl. Wszystkie chromatogramy rozwijano w poziomych komorach typu sandwich, z pominięciem ich wysycania parami rozpuszczalnika. Chromatogramy rozwijano na wysokość 9 cm. Po rozwinięciu chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej przez 15 minut, a następnie poddawano je derywatyzacji. Dla chromatogramów frakcji semi-polarnej (układ rozpuszczalników (1)) jako odczynnika wywołującego użyto 10% metanolowego roztworu kwasu siarkowego(VI), którym spryskano płytki i następnie ogrzewano je w temperaturze 105°C przez 10 minut. Z kolei dla chromatogramów frakcji polarnej (układ rozpuszczalników (2)) jako odczynnika wywołującego użyto 1% metanolowego roztworu chlorku glinu. Rejestrację fotograficzną chromatogramów wykonywano zarówno w świetle widzialnym, jak i w świetle UV przy długości fali $\lambda = 254$ nm oraz $\lambda = 366$ nm. Densytogramy wykonano przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm oraz $\lambda = 366$ nm. Dodatkowo zdjęcia i densytogramy zostały przetworzone przy użyciu programu Image J (program ten jest dostępny *on-line*, i jest on polecany do przetwarzania danych przez Narodowy Instytut Zdrowia USA). Zastosowane fazy ruchome zestawiono w tabeli 7 [67, 68].

Tab. 7. Fazy ruchome zastosowane podczas konstrukcji podwójnych fingerprintów techniką chromatografii cienkowarstwowej ekstraktów 20 gatunków szalwii zebranych w 2007 roku

Nr	Faza ruchoma (v/v)
1	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy (70 : 30 : 1)
1a	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy (68 : 32 : 1)
1b	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy (72 : 28 : 1)
1c	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy (70 : 30 : 0.8)
2	octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy (100 : 26 : 11 : 11)
2a	octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy (98 : 28 : 11 : 11)
2b	octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy (102 : 24 : 11 : 11)
2c	octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy (100 : 26 : 10 : 12)

Przeprowadzono także walidację metody, która polegała na sprawdzeniu specyficzności, precyzji (odtwarzalności i średniej precyzji), stabilności i odporności zgodnie z wytycznymi AOAC [69]. Precyzję wyrażono jako dokładność pozycji (wartość współczynnika R_F) rozdzielonych pasm. Sprawdzenie powtarzalności wyników polegało na przygotowaniu trzech porcji ekstraktów, zgodnie z wcześniejszym opisem metody ekstrakcji. Trzy porcje każdej z próbek naniesiono na trzy płytki chromatograficzne, a następnie poddano je procesowi chromatografowania używając w tym celu tej samej komory chromatograficznej, lecz każdorazowo używając nowej porcji eluentu. Test średniej precyzji przeprowadzono w analogiczny sposób, np. przeprowadzono rozdział chromatograficzny ekstraktów wybranych gatunków szalwii w trzy różne dni (jedna próbka dla jednego gatunku na każdy dzień). Na każdej z płytek oceniano również zmienność wartości współczynników retardacji dla kilku charakterystycznych stref oraz oceniano zmienność średnich wartości R_F dla tych charakterystycznych stref na trzech różnych płytkach. Stabilność próbek na płytkach została sprawdzona poprzez porównanie fingerprintów uzyskanych dla próbek naniesionych na płytki na jedną, dwie i trzy godziny przed jej rozwinięciem z chromatogramami otrzymanymi dla próbek naniesionymi tuż przed ich rozwinięciem. Stabilność próbki w roztworze została sprawdzona podczas wielu pomiarów tej samej próbki dla różnych okresów jej przechowywania, tj. 0, 6, 24 i 48 godzin. W celu sprawdzenia stabilności próbki podczas procesu chromatografowania przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem chromatografii dwukierunkowej. Polegał on na rozwinięciu płytki w dwóch prostopadłych do siebie kierunkach z zastosowaniem tej samej fazy ruchomej. Eksperymentowi poddano oba układy rozpuszczalników, tj. (1) i (2). Wpływ składu fazy ruchomej, temperatury ogrzewania i czasu suszenia również zostały sprawdzone. W tej części eksperymentu sprawdzono fazy ruchome 1a, 1b, 1c, 2a, 2b oraz 2c. Płytki spryskano 10% metanolem w roztworze kwasu siarkowego(VI) i ogrzewano w temperaturze 95, 100, 102, 105, 107 i 110°C. Aby sprawdzić wpływ czasu suszenia, chromatogram spryskiwano 10% metanolem w roztworze kwasu siarkowego(VI) po upływie 15, 20, 30 i 45 minut od wyciągnięcia z komory chromatograficznej.

W celu identyfikacji sporządzono metanolewe roztwory substancji wzorcowych o stężeniu 1 mg/ml. Otrzymane roztwory wzorców nanoszono przy pomocy aplikatora, a ich objętość każdorazowo wynosiła 5 µl. Częściową identyfikację składników badanych ekstraktów szalwii przeprowadzono porównując ich współczynniki retardacji (R_F), kolory oraz widma UV-Vis z parametrami wzorców. Podczas identyfikacji poszczególnych pasm wykorzystywano densytogramy, na których sprawdzano czystość pików poprzez rejestrację widm UV-Vis zarówno w ich centrum, jak i na obrzeżach.

2.3.4. Specjalne techniki rozwijania w analizie metanolowych ekstraktów szalwii

W kolejnym etapie analizy dla wybranych gatunków szalwii zastosowano specjalne techniki rozwijania chromatogramów, mianowicie gradientowe wielokrotne rozwijanie (GMD - ang. *Gradient Multiple Development*), wielokrotną elucję gradientową (MGD - ang. *Multiple Gradient Development*) oraz dwukierunkową chromatografię cienkowarstwową (2D-TLC) [70-78].

W eksperymencie użyto płytek szklanych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego. Przed użyciem płytki aktywowano przez 15 minut w temperaturze 110°C. Otrzymane ekstrakty nanoszono przy pomocy aplikatora, a objętość próbki każdorazowo wynosiła 10 µl. Wszystkie chromatogramy rozwijano w poziomych komorach typu sandwich, które wcześniej wysycano przez 15 minut parami fazy

ruchomej. Po rozwinięciu chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny, a następnie fotografowano pod lampą UV.

W przypadku techniki GMD chromatogramy rozwijano na stałą wysokość 9 cm z wykorzystaniem zestawu faz ruchomych o rosnącej sile elucyjnej. Między poszczególnymi rozwinięciami płytki pokryte żelom krzemionkowym dokładnie suszono. Dobierając układy chromatograficzne sprawdzano różne dwuskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników. W mieszaninach tych jako składnik polarny zastosowano kolejno acetonitryl, metanol, 1,4-dioksan oraz izopropanol. Rejestracje fotograficzną otrzymanych chromatogramów wykonywano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm.

Kolejną specjalną techniką rozwijania, którą zastosowano w niniejszych badaniach była technika MGD. W pierwszym kroku tej analizy płytki były rozwijane na długości 9 cm eluentem o najmniejszej sile elucyjnej. W każdym kolejnym etapie dystans rozwijania był skracany, jednocześnie stosując fazy ruchome o wzrastającej sile elucyjnej. Po każdym kolejnym etapie odległość, na jaką rozwijano płytki była określana na podstawie położenia wcześniej rozdzielonych plamek. Odległość tę dobierano w taki sposób, aby substancje rozdzielone we wcześniejszych etapach pozostały takimi w kolejnych krokach analizy. Płytkę z naniesionymi ekstraktami szalwii była rozwijana trójetapowo, przy użyciu następujących eluentów: I etap – izopropanol : n-heptan, 40 : 60 (v/v); II etap – izopropanol : n-heptan, 60 : 40 (v/v); III etap – metanol : kwas octowy : woda, 78 : 2 : 20 (v/v). Rejestracje fotograficzną otrzymanych chromatogramów wykonywano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm.

Przeprowadzono także analizę ekstraktów techniką chromatografii dwukierunkowej. W tym celu jako adsorbentów użyto polarnych chemicznie związanych faz stacjonarnych, diolowej i cyjanowej. Dla obu tych adsorbentów w pierwszym kierunku rozwijania jako eluent zastosowano mieszaninę izopropanolu i n-heptanu w stosunku objętościowym 30 : 70. Każdą płytkę rozwijano wymienionym eluentem dwukrotnie na długości 9 cm, co miało na celu lepsze rozdzielenie poszczególnych plamek. Następnie wciąż w tym samym kierunku rozwijania zastosowano mieszaninę izopropanolu, n-heptanu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 78 : 20 : 2. Drogi rozwijania chromatogramów dobrano tak, aby substancje rozdzielone w pierwszych dwóch etapach, pozostały takimi również po trzecim kroku. W drugim, prostopadłym do pierwszego kierunku, chromatogramy rozwijano na wysokość 9 cm stosując mieszaninę metanolu, wody oraz kwasu octowego w stosunku objętościowym 10 : 88 : 2. Rejestracje fotograficzną otrzymanych chromatogramów wykonywano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 254$ nm oraz $\lambda = 366$ nm.

2.3.5. Warunki chromatografowania zastosowane podczas określenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów szalwii przy użyciu stabilnego rodnika DPPH

W eksperymencie użyto płytek szklanych pokrytych warstwą żelu krzemionkowego. Przed użyciem płytki aktywowano przez 15 minut w temperaturze 110°C. Otrzymane ekstrakty nanoszono przy pomocy aplikatora, a objętość próbki każdorazowo wynosiła 10 μ l. Wszystkie chromatogramy rozwijano w poziomych komorach typu sandwich. W przypadku układu rozpuszczalników (2), komory wysycano przez 15 minut parami fazy ruchomej. Chromatogramy rozwijano na wysokość 9 cm. Po rozwinięciu chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej przez 15 minut, a następnie poddawano je derywatywacji. Zastosowano dwa rodzaje faz ruchomych i w układzie rozpuszczalników (1) (toluen + octan etylu + kwas mrówkowy,

60 : 40 : 1 (v/v)) przeprowadzono rozdział nisko polarnych substancji, natomiast w układzie rozpuszczalników (2) (octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy, 100 : 26 : 11 : 11 (v/v)) przeprowadzono rozdział semi- i wysoko polarnych substancji. Jako odczynnika wywołującego użyto roztworu uzyskanego przez zmieszanie 1 g waniliny z 20% metanolem roztworem kwasu siarkowego(VI), którym spryskano płytki i następnie ogrzewano je w temperaturze 105°C przez 5 minut. Rejestrację fotograficzną chromatogramów wykonywano w świetle widzialnym. Densytogramy wykonano przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm oraz $\lambda = 366$ nm.

W celu identyfikacji sporządzono metanolowe roztwory substancji wzorcowych o stężeniu 1 mg/ml. Otrzymane roztwory wzorców nanoszono przy pomocy aplikatora, a ich objętość każdorazowo wynosiła 5 μ l. Częściową identyfikację składników badanych ekstraktów szalwii przeprowadzono porównując ich współczynniki retardacji (R_F), kolory oraz widma UV-Vis z parametrami wzorców.

W celu określenia aktywności antyoksydacyjnej badanych próbek chromatogramy spryskiwano 0,2% metanolem roztworem DPPH i pozostawiano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Żółte zabarwienie pasm powstałe w wyniku odbarwienia fioletowego koloru pochodzącego od stabilnego rodnika DPPH, zinterpretowano jako efekt aktywności antyoksydacyjnej [79]. Dodatkowo uzyskane zdjęcia chromatogramów zostały przetworzone przy użyciu programu Image J, a substancje o aktywności antyoksydacyjnej zidentyfikowano jako ujemne piki. Walidację metody przeprowadzono w sposób wcześniej opisany w rozdziale 2.3.3.

2.3.6. Układy chromatograficzne zastosowane do optymalizacji rozdziału ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji związków fenolowych (TLC-MS vs. TLC-LC-MS)

Eksperyment chromatograficzny przeprowadzono zarówno w normalnym, jak i w odwróconym układzie faz dla ekstraktów gatunku szalwii lawendolistnej (*S. lavandulifolia*). Otrzymane ekstrakty nanoszono przy pomocy automatycznego aplikatora. Ekstrakty zawierające kwasy fenolowe nanoszono w objętości 25 μ l, natomiast ekstrakty zawierające flawonoidy nanoszono w objętości 40 μ l. Wszystkie chromatogramy rozwijano w poziomych komorach typu sandwich, które wcześniej wysycano przez 15 minut parami fazy ruchomej. Chromatogramy rozwijano na wysokość 15 cm, po czym suszono je w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Po wysuszeniu każdy chromatogram fotografowano pod lampą UV, przy dwóch długościach fali świetlnej $\lambda = 254$ nm oraz $\lambda = 366$ nm. Do analizy chromatogramów w odwróconym układzie faz uzyskanych przy zastosowaniu fazy stacjonarnej typu C_{18} użyto dodatkowo densytometru skanującego. Densytogramy rejestrowano przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Ponadto w celu identyfikacji sporządzono metanolowe roztwory jedenastu substancji wzorcowych kwasów fenolowych o stężeniu 1 mg/ml. Otrzymane roztwory wzorców nanoszono przy pomocy aplikatora, a ich objętość każdorazowo wynosiła 10 μ l. Identyfikację przeprowadzono przez porównanie wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz koloru poszczególnych pasm substancji wzorcowych z danymi pochodzącymi od próbek. Zastosowane układy chromatograficzne zestawiono w tabeli 8.

Tab. 8. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy techniką chromatografii cienkowarstwowej ekstraktów szalwii lawendolistnej (*S. lavandulifolia*)

Faza stacjonarna	Faza Ruchoma	Rodzaj ekstraktu
SiO ₂	octan etylu + toluen + kwas mrówkowy 7 : 3 : 1 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych oraz selektywnej ekstrakcji flawonoidów
SiO ₂	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy 7 : 3 : 1 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych oraz selektywnej ekstrakcji flawonoidów
SiO ₂	2-propanol + n-heptan 1 : 9 (v/v) 7 : 3 (v/v) 4 : 6 (v/v) 6 : 4 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych oraz selektywnej ekstrakcji flawonoidów
SiO ₂	metanol + woda + kwas mrówkowy 78 : 20 : 2 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych oraz selektywnej ekstrakcji flawonoidów
SiO ₂	chloroform + metanol 9,5 : 0,5 (v/v) 1 : 1 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych oraz selektywnej ekstrakcji flawonoidów
SiO ₂	aceton + toluen + kwas mrówkowy 7 : 3 : 1 (v/v) 5 : 5 : 1 (v/v) 6 : 4 : 1 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych oraz selektywnej ekstrakcji flawonoidów
RP-18	metanol + woda + kwas octowy 5 : 5 : 0,1 (v/v)	ekstrakt otrzymany w selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych

Do rozdziału flawonoidów za najlepszą fazę stacjonarną uznano żel krzemionkowy, zaś mieszaninę octanu etylu, toluenu i kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym 5 : 5 : 0,1 za najlepszy eluent. Z kolei do rozdziału kwasów fenolowych wybrano dwa układy chromatograficzne. W pierwszym z nich fazą stacjonarną był żel krzemionkowy, a fazą ruchomą była mieszanina octanu etylu, toluenu i kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym 7 : 3 : 1, natomiast w drugim wykorzystano fazę stacjonarną typu C₁₈, zaś mieszaninę metanolu, wody i kwasu octowego w stosunku objętościowym 5 : 5 : 0,1 jako eluent.

2.3.7. Układy chromatograficzne zastosowane do optymalizacji rozdziału ekstraktów uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych

W eksperymencie chromatograficznym użyto płytek szklanych pokrytych żelem krzemionkowym, celulozą i żelem krzemionkowym z kowalencyjnie związanymi, polarnymi ligandami aminopropylowymi. Otrzymane ekstrakty o objętości 10 µl (dla frakcji WKF, KKF, ZKF, GFO i GFB) oraz 20 µl (dla frakcji AF) наносono przy pomocy automatycznego aplikatora pasmami o długości 1cm. Wszystkie chromatogramy rozwijano w poziomych komorach typu sandwich, które wcześniej wysycano przez 15 minut parami fazy ruchomej. Chromatogramy rozwijano na

wysokość 15 cm, po czym suszono je w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Po wysuszeniu każdy chromatogram fotografowano pod lampą UV, przy dwóch długościach fali $\lambda = 254$ nm oraz $\lambda = 366$ nm. Następnie chromatogramy wywoływano spryskując je 1% metanolem w roztworze chlorku glinu i ponownie fotografowano pod lampą UV, przy dwóch długościach fali świetlnej.

W celu osiągnięcia możliwie najlepszego rozdziału zastosowano przedstawione w tabelach 9 i 10 układy chromatograficzne.

Tab. 9. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy techniką chromatografii cienkowarstwowej frakcji wolnych i uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasów fenolowych (**WKF**, **KKF** i **ZKF**)

Faza Stacjonarna	Faza Ruchoma
SiO ₂	octan etylu + metanol + woda 77 : 13 : 10 (v/v) [80]
SiO ₂	chloroform + kwas octowy + woda 4 : 1 : 1 (v/v) [81, 82]
SiO ₂	chloroform + metanol + woda 6 : 3 : 1 (v/v) [83]
SiO ₂	toluen + chloroform + aceton + kwas mrówkowy 8 : 4 : 3 : 3 (v/v) [84] 2 : 2 : 1 : 1 (v/v)
SiO ₂	benzen + octan etylu + kwas mrówkowy 6 : 3 : 1 (v/v) [84]
SiO ₂	benzen + woda + 2-butanon + kwas mrówkowy 6 : 3 : 3 : 1 (v/v)
NH ₂	eter diizopropylowy + eter naftowy + kwas octowy 6 : 3 : 1 (v/v) [63]
NH ₂	benzen + metanol + kwas octowy 45 : 8 : 4 (v/v) [85]
Celuloza	chloroform + kwas octowy + woda 4 : 1 : 1 (v/v) [81,86]
SiO ₂	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy 6 : 3 : 1 (v/v)

Za najlepszą fazę stacjonarną uznano żel krzemionkowy, zaś mieszaninę benzenu, octanu etylu i kwasu mrówkowego w stosunku objętościowym 6 : 3 : 1 za najlepszy eluent.

Tab. 10. Układy chromatograficzne zastosowane podczas analizy techniką chromatografii cienkowarstwowej frakcji aglikonów i glikozydów flawonoidowych (AF, GFO i GFB)

Analizowana frakcja	Faza stacjonarna	Faza ruchoma
aglikony i glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	octan etylu + kwas mrówkowy + woda 10 : 2 : 3 (v/v) [87]
aglikony i glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy + woda 2 : 18 : 5 : 4 (v/v) [88]
glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	chloroform + metanol + octan etylu + woda 20 : 40 : 22 : 10 (v/v) [89]
glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	toluen + aceton + metanol + kwas octowy 46 : 8 : 5 : 1 (v/v) [90]
glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	octan etylu + 2-butanon + kwas mrówkowy + woda 5 : 3 : 1 : 1 (v/v) [80,91]
glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	n-butanol + kwas octowy + woda 4 : 1 : 5 (v/v) [80, 91]
aglikony flawonoidowe	SiO ₂	octan etylu + toluen + kwas mrówkowy + woda 18 : 2 : 5 : 4 (v/v)
aglikony flawonoidowe	SiO ₂	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy 12 : 6 : 1 (v/v)
aglikony flawonoidowe	NH ₂	metanol + kwas octowy + woda 18 : 1 : 1 (v/v) [92]
glikozydy flawonoidowe	NH ₂	woda + etanol + 2-butanon + acetyloaceton 13 : 3 : 3 : 1 (v/v) [92]
glikozydy flawonoidowe	NH ₂	woda + etanol + acetyloaceton 4 : 2 : 1 (v/v)
glikozydy flawonoidowe	SiO ₂	octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy 100 : 26 : 11 : 11 [68]

Za najlepszy układ chromatograficzny do rozdziału aglikonów flawonoidowych uznano: fazę stacjonarną: żel krzemionkowy, fazę ruchomą: toluen + octan etylu + kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 12 : 6 : 1. Natomiast za najlepszy układ chromatograficzny do rozdziału glikozydów flawonoidowych uznano: fazę stacjonarną: żel krzemionkowy, fazę ruchomą: octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy w stosunku objętościowym 100 : 26 : 11 : 11.

2.4. Analiza ekstraktów roślinnych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej

2.4.1. Warunki rozdziału zastosowane podczas porównania metod ekstrakcji oraz do analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej

W celu porównania metod ekstrakcji oraz przeprowadzenia analizy jakościowej i ilościowej ekstraktów szalwii (zebranych w 2007 roku) uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej wykorzystano elucję izokratyczną w układzie acetonitryl : woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego w stosunku objętościowym 55 : 45. Badania przeprowadzono przy użyciu chromatografu

cieczowego firmy GyncoTek, wyposażonego w autosampler, detektor fotodiodowy DAD oraz kolumnę chromatograficzną C₁₈ firmy Varian o wymiarach 250 mm × 4,6 mm i średnicy ziarna 5 µm. Podczas analizy wykorzystano oprogramowanie Chromeleon Dionex v. 6.4. Próbkę dozowano w ilości 40 µl. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,6 ml/min, a czas analizy wynosił 80 minut. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali świetlnej $\lambda = 225\text{nm}$.

Ponadto przeprowadzono analizę ekstraktów szalwii (zebranych w 2007 i 2008 roku) uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej, mającą na celu porównanie informacji o charakterze fingerprintu zawartych w chromatogramach z wykorzystaniem dwóch rodzajów detekcji, DAD i ELSD. Przeprowadzono szereg eksperymentów z zastosowaniem gradientu stężeń fazy ruchomej w układzie metanol : woda. Badania przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego 920-LC firmy Varian, wyposażonego w autosampler, pompę gradientową, detektor fotodiodowy DAD oraz fotodyspersyjny detektor laserowy ELSD, kolumnę chromatograficzną C₁₈ firmy Varian o wymiarach 250 mm × 4,6 mm i średnicy ziarna 5 µm. Podczas analizy wykorzystano oprogramowanie Galaxie. Próbkę dozowano w ilości 10 µl. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,6 ml/min, a czas analizy wynosił 60 minut. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali świetlnej $\lambda = 220\text{ nm}$. Profil gradientu zastosowany w analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej ekstraktów zawierających związki fenolowe przedstawiono w tabeli 11.

Częściową identyfikację składników badanych ekstraktów szalwii przeprowadzono z wykorzystaniem czternastu substancji wzorcowych. W tym celu sporządzono metanolowe roztwory tych substancji o stężeniu 0,5 mg/ml. Roztwory wzorcowe dozowano w ilości 10 µl. Identyfikacja polegała na porównaniu czasów retencji oraz widm UV próbki z parametrami wzorców.

Tab. 11. Profil gradientu zastosowany w analizie ekstraktów zawierających kwasy fenolowe i flawonoidy. A - metanol, B - woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego.

Czas [min]	A[%]	B[%]
0	50	50
15	80	20
25	90	10
45	100	0
57	50	50

2.4.2. Warunki rozdziału zastosowane podczas eksperymentu TLC-LC-MS dla ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji związków fenolowych

W celu porównania dwóch technik rozdziału związków fenolowych, a mianowicie techniki TLC-MS oraz TLC-LC-MS wykorzystano elucję izokratyczną w układzie metanol : lodowaty kwas octowy w stosunku objętościowym 99,5 : 0,5 oraz czysty metanol. Analizy przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego 920-LC firmy Varian, wyposażonego w detektor masowy MS, oraz kolumnę chromatograficzną X R_S 3-C₁₈ firmy Varian o wymiarach 50 mm × 2 mm i średnicy ziarna 3 µm. Próbkę dozowano w ilości 5 µl. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,2 ml/min, a czas analizy wynosił 20 minut.

2.4.3. Warunki rozdziału zastosowane podczas analizy jakościowej ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji flawonoidów

W celu optymalizacji rozdziału flawonoidów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, wykonano szereg prób z zastosowaniem gradientu fazy ruchomej w układzie metanol : woda. Badania przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego 920-LC firmy Varian, wyposażonego w autosampler, pompę gradientową, detektor fotodiodowy DAD, kolumnę chromatograficzną C₁₈ firmy Varian o wymiarach 250 mm × 4,6 mm i średnicy ziarna 5 µm. Podczas analizy wykorzystano oprogramowanie Galaxie. Próbkę dozowano w ilości 20 µl. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,6 ml/min, a czas analizy wynosił 70 minut. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm. Profil gradientu zastosowany w analizie ekstraktów zawierających flawonoidy przedstawiono w tabeli 12.

Tab. 12. Profil gradientu zastosowany w analizie ekstraktów zawierających flawonoidy. A - metanol, B - woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego.

Czas [min]	A[%]	B[%]
0	50	50
18	80	20
27	90	10
47	100	0
59	50	50

2.4.4. Warunki rozdziału zastosowane podczas analizy jakościowej ekstraktów uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych

Podjęto próbę optymalizacji rozdziału związków fenolowych zawartych w uzyskanych ekstraktach, techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W tym celu wykonano szereg eksperymentów z zastosowaniem gradientu fazy ruchomej w układzie acetonitryl : woda. Badania przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego 920-LC firmy Varian, wyposażonego w autosampler, pompę gradientową, detektor fotodiodowy DAD oraz fotodyspersyjny detektor laserowy ELSD, kolumnę chromatograficzną C₁₈ firmy Varian o wymiarach 250 mm × 4,6 mm i średnicy ziarna 5 µm. Podczas analizy wykorzystano oprogramowanie Galaxie. Próbkę dozowano w ilości 5 µl. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,8 ml/min, a czas analizy wynosił 40 minut. Chromatogramy rejestrowano przy długości fali świetlnej $\lambda = 220$ nm. Profil gradientu zastosowany w analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej ekstraktów zawierających związki fenolowe przedstawiono w tabeli 13.

Tab. 13. Profil gradientu zastosowany w analizie ekstraktów zawierających kwasy fenolowe i flawonoidy. A - acetonitryl, B - woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego.

Czas [min]	A[%]	B[%]
0	20	80
8	40	60
14	60	40
20	100	0
37	20	80

2.5. Oznaczenia spektrofotometryczne sumy zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów

Osobnemu oznaczeniu poddano wyciągi uzyskane podczas selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych i selektywnej ekstrakcji flawonoidów 26 gatunków szalwii zebranych w latach od 2007 do 2009.

2.5.1. Spektrofotometryczne oznaczanie sumy zawartości kwasów fenolowych [54]

Do spektrofotometrycznego oznaczenia sumy zawartości kwasów fenolowych sporządzano dwa roztwory. Do probówek miarowych o pojemności 10 ml odmierzano w odpowiedniej kolejności 0,1 ml wodnego ekstraktu roślinnego, 5 ml wody, 1 ml 0,5-molowego kwasu solnego, 1ml odczynnika Arnova (wodny roztwór zawierający 10 g molibdenianu sodu i 10 g azotanu(III) sodu w 100 ml), 1 ml jednomolowego roztworu wodorotlenku sodu i całość uzupełniano wodą do objętości 10 ml. Absorbancję roztworu mierzono przy długości fali świetlnej $\lambda = 490$ nm, stosując jako odnośnik mieszaninę odczynników nie zawierającą wyciągu roślinnego. Procentową zawartość kwasów fenolowych (X) obliczano w przeliczeniu na kwas kawowy według wzoru:

$$X = \frac{A \cdot k}{m}$$

gdzie:

X – procentowa zawartość kwasów fenolowych
A – absorbancja
k – przelicznik dla kwasu kawowego $k = 0,877$
m – masa materiału roślinnego [g]

Dla każdego z dwóch uzyskanych wyciągów wykonano trzy niezależne pomiary spektrofotometryczne.

2.5.2. Spektrofotometryczne oznaczanie sumy zawartości flawonoidów [54]

Do spektrofotometrycznego oznaczania sumy zawartości flawonoidów sporządzano dwa roztwory. Z otrzymanego, octanowego ekstraktu roślinnego pobierano 10 ml, dodawano 2 ml chlorku glinu (20 g/l) i uzupełniano mieszaniną kwasu octowego (1,02 kg/l) i metanolu (w stosunku objętościowym 1:19) do objętości 25 ml. Jako odnośnik stosowano roztwór otrzymany po zmieszaniu 10 ml ekstraktu roślinnego i 15 ml mieszaniny kwasu octowego z metanolem. Po 45 min mierzono absorbancję przy długości fali świetlnej $\lambda = 425$ nm. Procentową zawartość flawonoidów (X) obliczano w przeliczeniu na hiperozyd według wzoru:

$$X = \frac{A \cdot k}{m}$$

gdzie:

X – procentowa zawartość flawonoidów
A – absorbancja
k – przelicznik dla hiperozydu $k = 1,25$
m – masa materiału roślinnego [g]

Dla każdego z dwóch uzyskanych wyciągów wykonano trzy niezależne pomiary spektrofotometryczne.

2.6. Chemometryczna analiza chromatogramów cieczowych zastosowana do wybranych ekstraktów szalwii

Operowanie chromatogramami próbek naturalnych jest niełatwym zadaniem, dlatego chromatogramy takie używane są jako tzw. odciski palca w trakcie szybkiej i kompleksowej analizy próbek. W tym rozdziale przedstawiono krótką charakterystykę zastosowanych metod chemometrycznych, których celem było poprawienie jakości badanych chromatogramów HPLC przez korektę linii bazowej oraz szumu. Celem tego zabiegu było wstępne przygotowanie chromatogramów do eksploracji oraz wizualizacji, przez zastosowanie metody analizy czynników głównych (PCA – ang. *Principal Components Analysis*).

2.6.1. Eliminacja tła sygnału analitycznego

Istnieje wiele metod, które mogą być stosowane w celu usunięcia tła sygnału analitycznego. Do nich zalicza się metodę asymetrycznych najmniejszych kwadratów z funkcją kary, (PALS – ang. *Penalized Asymmetric Least Squares*), zaproponowana przez Eilersa [93]. Jest to procedura iteracyjna, gdzie linia bazowa b jest aproksymowana do sygnału x , wykorzystując metodę najmniejszych kwadratów. Kluczowe założenie tej metody polega na tym, że każdy punkt sygnału ma inną wagę. Minimalizowana w trakcie estymacji linii bazowej funkcja kosztów, Q , jest zdefiniowana następująco:

$$Q = \sum_{i=1}^n w_i (x_i - b_i)^2 + \lambda (\Delta^d b_i)^2$$

gdzie:

w_i - i-ta waga,

n - liczba punktów pomiarowych w sygnale,

λ - tzw. parametr kary,

d - rząd różnic Δ elementów sygnału.

Aby metoda PALS działała poprawnie, należy zoptymalizować dwa parametry, λ i d . W większości przypadków zadowalające przybliżenie linii bazowej otrzymuje się, gdy $d = 2$. Parametr kary λ odpowiada z kolei za gładkość linii bazowej. Im wyższa wartość λ , tym linia bazowa jest bardziej wygładzona.

2.6.2. Usuwanie szumu z sygnału analitycznego

Do eliminacji tzw. białego szumu (szumu Gaussa) z sygnałów analitycznych można użyć różnego rodzaju filtrów cyfrowych w domenie czasu lub częstotliwości, jak np. średniej ruchomej, filtru Sawickiego-Golay'a, itp. W ciągu ostatnich lat, odszumianie sygnałów chromatograficznych przy pomocy falek stało się bardzo popularne, ponieważ w skuteczny sposób pozwala wyeliminować tzw. biały szum, występujący w sygnałach niestacjonarnych. Chromatogramy są typowymi przykładami takich sygnałów instrumentalnych, ponieważ zawierają składowe o bardzo różnych częstotliwościach [94-98].

Transformacja falkowa przekształca pojedynczy sygnał analityczny x , z jego pierwotnej domeny (domeny czasu) do domeny falkowej (domeny częstotliwości). Falki to zestaw określonych funkcji bazowych, które są ortogonalne i lokalne. Dzięki unikalnym własnościom są one bardzo skuteczne przy modelowaniu sygnałów niestacjonarnych, pozwalając na ich analizę na różnych poziomach rozdzielczości.

W domenie falkowej każdy sygnał jest opisany przez zbiór tzw. współczynników falkowych c :

$$c = W^T x$$

gdzie:

W - macierz zawierająca wektory bazowe w kolumnach,

x - sygnał analityczny.

Przetwarzanie sygnałów instrumentalnych w domenie falkowej może być bardzo efektywne, gdy do obliczeń wykorzystywany jest tzw. algorytm piramidalny, jednak można go używać jedynie do sygnałów o jednakowej długości. Do regulacji pożądanej długości sygnału można wykorzystać kilka podejść. Sygnały są rozkładane w kilku kolejnych krokach. Domena czasu sygnału jest dzielona rekurencyjnie na pół przy pomocy filtrów (*low-pass filter* i *high-pass filter*). Na każdym poziomie dekompozycji uzyskiwane są dwa zestawy współczynników falkowych, tj. $n/2$ współczynników o niskiej częstotliwości (tzw. aproksymacji) oraz $n/2$ współczynników o wysokiej częstotliwości (tzw. detali). Detale uzyskane z pierwszego poziomu dekompozycji sygnału zawierają informacje o szumie. Na ich podstawie możliwe jest określenie i wyeliminowanie szumu. Po usunięciu tych detali, sygnał jest przekształcany z powrotem z domeny częstotliwości do domeny czasu, co ostatecznie prowadzi do uzyskania sygnału oczyszczonego z szumu [99-100].

2.6.3. Nakładanie sygnałów analitycznych

Przed analizą chemometryczną, sygnały chromatograficzne muszą zostać wyrównane. Techniki chromatograficzne, szczególnie wysokosprawna chromatografia cieczowa są podatne na różne zakłócenia instrumentalne, które zazwyczaj są spowodowane przez zjawiska starzenia się kolumny, niezamierzone zmiany w składzie fazy ruchomej, trudności w odtwarzaniu identycznych warunków gradientu i temperatury podczas analizy itp. Z takimi problemami mamy do czynienia wówczas, gdy eksperyment prowadzony jest na szeroka skalę i analiza próbek odbywa się przez dłuższy okres czasu. Może to prowadzić do przesunięcia pików wzdłuż osi czasu, co uniemożliwia porównanie różnych chromatogramów. W celu pozbycia się problemów z przesunięciem pików stosuje się techniki nakładania sygnałów analitycznych. Ich celem jest dopasowanie odpowiednich pików w analizowanych chromatogramach do siebie. Dostosowanie sygnałów instrumentalnych nie należy do trywialnych zadań, ponieważ nieznana jest zgodność poszczególnych pików. Stosując techniki nakładania sygnałów analitycznych, można stosunkowo łatwo dopasować piki między odpowiednimi punktami par sygnałów stosując liniową interpolację. Metoda *COW* (ang. *Correlation Optimized Warping*) jest bardzo często stosowana do nakładania sygnałów analitycznych. Używając metody *COW*, piki znajdujące się w sygnale analitycznym P są dopasowywane do ich odpowiedników w sygnale wzorcowym T . Aby osiągnąć jak najlepsze rezultaty dopasowania, współczynnik korelacji między sygnałami P i T musi być maksymalny. W metodzie tej należy zoptymalizować dwa parametry, długość sekcji N i parametr t . Początkowo chromatogramy P i T dzieli się na N sekcji, z których każda posiada punkt początkowy i końcowy. Sekcje sygnału P są następnie wypaczane przez zmianę położenia punktów końcowych. Gdy $t = 1$, każdy końcowy punkt może mieć trzy możliwe lokalizacje: $[-1, 0, 1]$. Ten zapis oznacza odpowiednio, że dana sekcja została skrócona jeden punkt, że długość sekcji pozostała niezmienniona oraz, że sekcja została wydłużona o jeden

punkt [93, 101-107]. Szczegółowy opis algorytmu *COW* można znaleźć w literaturze [102].

2.6.4. Analiza czynników głównych (PCA)

Analiza czynników głównych jest szczególnym przypadkiem metody poszukiwania projekcji, w której jako indeksu projekcji używa się wariancję. PCA (ang. – *Principal Components Analysis*) stosuje się głównie do modelowania, kompresji i wizualizacji wielowymiarowych danych [108-111]. Zadaniem PCA jest przedstawienie danych, \mathbf{X} , o m obiektach i n zmiennych, jako iloczynu dwóch nowych macierzy \mathbf{T} ($m \times f$) i \mathbf{P} ($n \times f$), gdzie $f \ll n$, które zawierają współrzędne obiektów i parametrów na kierunkach maksymalizujących opis wariancji danych. O liczbie kolumn macierzy \mathbf{T} i \mathbf{P} , czyli o kompleksowości modelu PCA, decyduje rząd chemiczny macierzy \mathbf{X} , który jest co najwyżej równy jej rzędowi matematycznemu. Model PCA można wyrazić następująco:

$$\mathbf{X}_{[m,n]} = \mathbf{T}_{[m,f]} \mathbf{P}_{[f,n]}^T + \mathbf{E}_{[m,n]}$$

gdzie:

\mathbf{T} - macierz wyników,

\mathbf{P} - macierz wag,

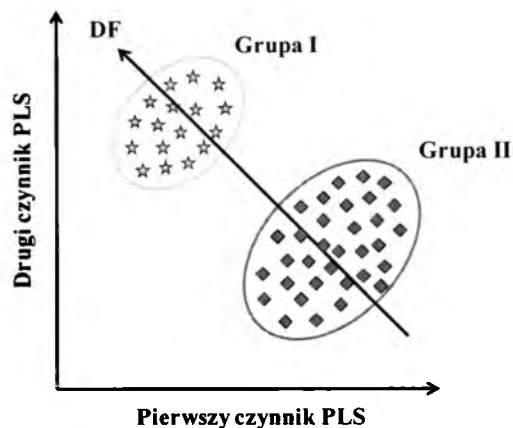
\mathbf{E} - macierz reszt od modelu PCA z f czynnikami głównymi.

Kolumny macierzy \mathbf{T} i \mathbf{P} zawierają współrzędne obiektów i parametrów na nowych ukrytych zmiennych, nazywanych czynnikami głównymi. Czynniki główne są konstruowane iteracyjnie tak, aby maksymalizować opis wariancji danych. Każdy kolejny czynnik główny opisuje niewyjaśnioną przez poprzednie czynniki wariancję danych i dlatego jego wkład do opisu całkowitej wariancji danych jest mniejszy. Kolumny \mathbf{T} są ortogonalne, a kolumny \mathbf{P} ortonormalne, czyli mają jednostkową długość i są ortogonalne. Biorąc pod uwagę wspomniane ograniczenia dotyczące konstrukcji czynników głównych, przedstawione powyżej równanie ma jednoznaczne rozwiązanie. Z każdym czynnikiem głównym jest stowarzyszona tzw. wartość własna, v_i . Oblicza się ją jako sumę kwadratów wartości wyników dla danego czynnika głównego. Wartości własne ilościowo określają wariancję danych opisaną przez kolejne czynniki. Czynniki główne pozwalają na określenie podobieństwa między próbkami, z kolei wagi niosą informację o udziale poszczególnych zmiennych. Gdy dwie próbki są do siebie podobne składem chemicznym, są one również blisko położone w wizualizacji wyników. Wysokie podobieństwo między dwoma zmiennymi eksperymentalnymi przejawia się niewielkim kątem między dwoma wektorami wag [112].

2.6.5. Dyskryminacyjna metoda częściowych najmniejszych kwadratów

Dyskryminacyjna metoda częściowych najmniejszych kwadratów (DPLS – ang. *Discriminant Partial Least Squares*) [113] jest powszechnie stosowana w chemii do modelowania danych z uwagi na możliwość analizy wielowymiarowych danych o skorelowanych parametrach. W modelu DPLS konstruowana jest liniowa zależność pomiędzy zestawem zmiennych zależnych (\mathbf{X}) oraz zmienną niezależną (\mathbf{y}). Zmienna zależna może być ciągła lub dyskretna.

Metoda DPLS polega na zastąpieniu oryginalnych zmiennych nowymi, tzw. ukrytymi czynnikami, które są konstruowane tak, aby maksymalizować wariancję pomiędzy grupami obiektów, a jednocześnie minimalizować wariancję wewnątrz każdej grup. Jest to tzw. kryterium Fishera (Rys. 1.).



Rys. 1. Przykładowa konstrukcja funkcji dyskryminacyjnej (DF) dla danych zawierających dwie grupy obiektów w przestrzeni czynników PLS.

Po utworzeniu funkcji dyskryminacyjnych w oparciu o próbki ze zbioru modelowego, są one wykorzystywane do przewidywania przynależności nowych próbek do jednej z rozpatrywanych grup. Macierz zmiennych niezależnych \mathbf{X} w metodzie DPLS wyraża wzór:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T$$

gdzie

\mathbf{X} – macierz danych,

\mathbf{t}_a – wektor wyników dla macierzy \mathbf{X} ,

\mathbf{p}_a^T – wektor wag dla macierzy \mathbf{X} .

Podobnie, jak w metodzie PCA, każda następna zmienna ukryta opisuje coraz mniej kowariancji między \mathbf{X} , a \mathbf{y} , dlatego też konieczny jest wybór optymalnej kompleksowości modelu. Model konstruowany jest w oparciu o próbki ze zbioru modelowego, a jego właściwości predykcyjne są testowane w oparciu o niezależny zbiór testowy, który nie bierze udziału w konstrukcji modelu. Można założyć, iż zbiór modelowy tworzy 70-75% wszystkich obiektów, a pozostałe trafiają do zbioru testowego, jednakże kwestia ta każdorazowo pozostaje w gestii analityka. Do podziału obiektów na zbiory powszechnie wykorzystuje się algorytm Kennarda i Stone'a lub Duplex [114].

Wszystkie obliczenia były wykonywane w środowisku obliczeniowym Matlab R2010a przy użyciu dostępnego oprogramowania peryferyjnego i pomocniczego.

3. Wyniki badań własnych i ich omówienie

3.1. Zastosowane metody ekstrakcji składników chemicznych z materiału roślinnego na przykładzie szalwii lekarskiej (*S. officinalis*)

W pierwszym etapie prezentowanych niniejszym badań skoncentrowano się na porównaniu wykorzystanych metod ekstrakcji związków fenolowych (tj. kwasów fenolowych i flawonoidów) z materiału roślinnego (dla przykładu wybrano szalwię lekarską) tak, aby najefektywniejsza z nich pozwoliła na dalszą analizę pozostałych gatunków szalwii technikami chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Pierwszą z przeprowadzonych metod ekstrakcji była tzw. ekstrakcja tradycyjna. Mianowicie w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną umieszczano materiał roślinny, który dwukrotnie ekstrahowano n-heksanem w celu eliminacji chlorofilu. Powstałe w wyniku tej ekstrakcji frakcje heksanowe odrzucano. Następnie odsączony i wysuszony materiał roślinny poddawano ekstrakcji chloroformem. Otrzymaną w ten sposób frakcję chloroformową odparowywano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczano w metanolu. Metanolowy ekstrakt oznaczono jako T (Rys. 2).

W kolejnych trzech porównywanych wariantach ekstrakcji wykorzystano technikę ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej (ASE – ang. *Accelerated Solvent Extraction*). Umieszczony w metalowych celkach materiał roślinny ekstrahowano w aparacie ASE 200 (ASE – ang. *Accelerated Solvent Extractor*) z użyciem podanych niżej procedur.

W pierwszym wariantcie tej metody ekstrakcji jako ekstrahentów użyto n-heksanu oraz metanolu. Wstępnie przeprowadzano jednokrotną ekstrakcję materiału roślinnego n-heksanem. Otrzymany ekstrakt heksanowy odrzucano, gdyż ekstrakcja ta miała na celu eliminację chlorofilu, o czym wspomniano również przy omówionej wcześniej metodzie ekstrakcji tradycyjnej. Następnie materiał roślinny jednokrotnie ekstrahowano metanolem. Powstały ekstrakt odparowywano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczano w metanolu. Otrzymany tą metodą ekstrakt oznaczono jako ASE (1) (Rys. 2).

Drugim wariantem ekstrakcji substancji chemicznych z materiału roślinnego, wykorzystującym technikę ASE, była jednokrotna ekstrakcja z użyciem wyłącznie jednego ekstrahenta, jakim w tym przypadku był metanol. Uzyskany w ten sposób ekstrakt oznaczono jako ASE (2) (Rys. 2).

Trzecim i zarazem ostatnim wariantem ekstrakcji, przeprowadzoną techniką ASE, była ekstrakcja mieszaniną metanolu i wody w stosunku objętościowym 8 : 2. Otrzymany ekstrakt został oznaczony jako ASE (3) (Rys. 2).

Tak przygotowane ekstrakty poddano analizie technikami chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC/DAD).

3.1.1. Porównanie metod ekstrakcji szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z detekcją densytometryczną

Głównym celem analizy przeprowadzonej techniką TLC z detekcją densytometryczną było porównanie efektywności wykorzystanych metod ekstrakcji. Drugim celem tej analizy było uzyskanie odcisków palców (czyli fingerprintów) o jak największej ilości pasm pochodzących od związków biologicznie czynnych, zawartych w badanych ekstraktach szalwii.

Podczas opracowywania własnej procedury chromatograficznej wzorowano się na danych literaturowych, dotyczących rozdziału oraz identyfikacji związków

fenolowych w materiale roślinnym [59-64]. Wzorowanie to polegało na praktycznym porównywaniu sprawności rozdzielczej różnych układów chromatograficznych, proponowanych w literaturze z wykorzystaniem uzyskanych w naszym eksperymencie ekstraktów szalwii jako mieszanin testowych. Przeprowadzono zatem szereg prób, w wyniku których za najlepszą fazę stacjonarną uznano żel krzemionkowy, zaś mieszaninę toluenu i 1,4-dioksanu w stosunku objętościowym 7 : 2 za najlepszy eluent. Zastosowana mieszanina stanowiła zmodyfikowaną przez nas fazę ruchomą, zaproponowaną przez Glenska i in. [61]. Modyfikacja ta polegała na usunięciu ze składu fazy ruchomej kwasu mrówkowego, dzięki czemu wyeliminowano problem jej demiksji. Wideoskany rejestrowano przy użyciu wideoskanera w świetle UV, przy długości fali $\lambda = 254 \text{ nm}$.

W wyniku zastosowania takiego właśnie układu chromatograficznego otrzymano chromatogramy oraz densytogramy, na podstawie których porównano ilości oraz intensywności powstałych pasm, a co za tym idzie, wybrano najefektywniejszą z przeprowadzonych metod ekstrakcji.

Porównując otrzymane chromatogramy, stwierdzono obecność co najmniej dwunastu substancji (Rys. 2a) w metanолоwym ekstrakcie (ASE (1)). Pozostałe trzy ekstrakty (T, ASE (2), ASE (3)) wykazały mniejszą ilość i/lub intensywność rozdzielonych pasm.

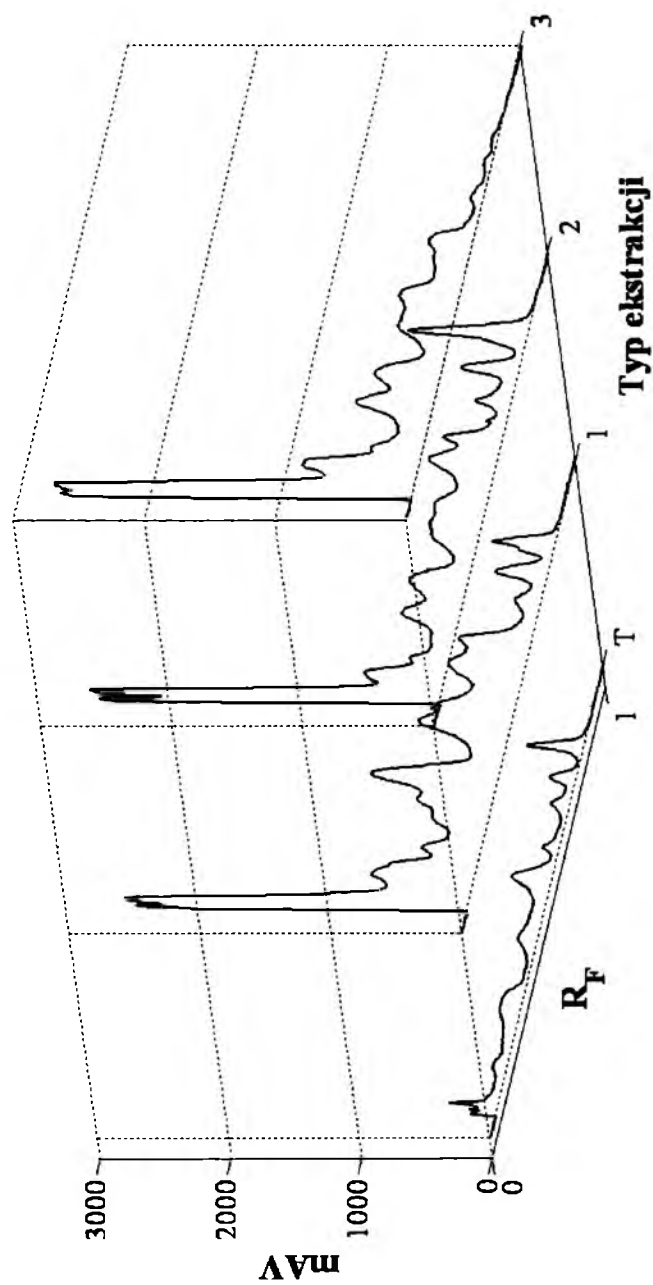
Po wysuszeniu chromatogramy poddawano analizie densytometrycznej, a uzyskane densytogramy rejestrowano przy użyciu densytometru skaningowego w świetle UV, przy długości fali, $\lambda = 340 \text{ nm}$. Porównując densytogramy (Rys. 2b) brano pod uwagę ilość oraz intensywność uzyskanych pików. Najwięcej pików o największej intensywności stwierdzono również w ekstrakcie uzyskanym metodą ASE (1).

Tak więc na podstawie wyników uzyskanych techniką chromatografii cienkowarstwowej za najefektywniejszą metodę ekstrakcji uznano tę, w której materiał roślinny najpierw ekstrahowano n-heksanem, a następnie metanolem techniką ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej (ASE (1)).

W celu pełniejszej analizy i identyfikacji rozdzielonych substancji zawartych w metanолоwym ekstrakcie szalwii (ASE (1)) przeprowadzono badania z wykorzystaniem substancji wzorcowych. Na podstawie współczynników retardacji (R_F) oraz widm UV zarejestrowanych *in situ* zidentyfikowano następujące związki: kwas ferulowy, kwas o-kumarowy, apigeninę oraz glukozyd apigeniny. Wartości współczynników retardacji (R_F) umieszczono w tabeli 14, a odpowiednie widma UV przedstawiono w tabeli 15.



a)



b)

Rys. 2. a) Wideooskany oraz b) densytogramy chromatogramów czterech ekstraktów szalwii lekarskiej (*S. officinalis*). Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Rejestracja wideooskanów przy długości fali świetlnej $\lambda = 254 \text{ nm}$. Rejestracja densytogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 340 \text{ nm}$. Ekstrakcja metodą ASE (1); ekstrakcja metodą ASE (2); ekstrakcja metodą ASE (3). Ekstrakt nanoszono w ilości 5 μl .

Tab. 14. Lista substancji wzorcowych zastosowanych w eksperymencie i ich współczynniki retardacji (R_F)

SUBSTANCJA WZORCOWA	R_F	SUBSTANCJA WZORCOWA	R_F
Kwas wanilinowy	0,48	Kwas ferulowy	0,40
Kwas kawowy	0,21	Apigenina	0,29
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy	0,54	Luteolina	0,16
Kwas syringowy	0,37	Mirycetyna	0,03
Kwas rozmarynowy	0,04	Kwercetyna	0
Kwas <i>m</i> -kumarowy	0,39	Kwercytryna	0
Kwas <i>o</i> -kumarowy	0,38	Izokwercytryna	0
Kwas <i>p</i> -kumarowy	0,36	Rutyna	0
Kwas chlorogenowy	0	Kemferol	0,37
Kwas galusowy	0,24	Hiperozyd	0
Kwas <i>m</i> -hydroksybenzoesowy	0,16	Glukozyd apigeniny	0,27
Kwas <i>p</i> -hydroksybenzoesowy	0,19	Glukozyd kemferolu	0
Kwas elagowy	0,10	Glukozyd luteoliny	0,17
Kwas protokatechowy	0,23	Glukozyd hesperetyny	0
Kwas izowanilinowy	0,35	-	

Mając na uwadze ograniczone możliwości rozdzielcze techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC), postanowiono dodatkowo przeprowadzić analizę i porównanie składu czterech badanych ekstraktów szalwii techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

3.1.2. Porównanie metod ekstrakcji szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC/DAD)

Z podanej wcześniej przyczyny, w dalszym kroku analitycznym cztery ekstrakty szalwii (oznaczone jako T, ASE (1), ASE (2) i ASE (3)) poddano analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC/DAD). Celem przeprowadzonego eksperymentu było potwierdzenie słuszności rezultatu otrzymanego techniką chromatografii cienkowarstwowej, a wskazującego na to, że ekstrakt uzyskany techniką ASE (1) jest najbogatszy zarówno w sensie jakościowym, jak i w ilościowym w substancje pochodzenia naturalnego.

Na rysunkach 3a-d przedstawiono chromatogramy ekstraktów szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) uzyskanych według czterech różnych procedur ekstrakcyjnych. Ponadto należy podkreślić, iż mimo zastosowania substancji wzorcowych chromatogramy te przede wszystkim spełniają rolę fingerprintów.

Warunki przeprowadzonego rozdziału chromatograficznego nie zostały zoptymalizowane dla każdego ekstraktu z osobna, gdyż na tym etapie naczelnym celem było porównanie między sobą czterech zastosowanych metod ekstrakcyjnych pod względem ich wydajności. Skutkiem tego na niektórych chromatogramach (głównie na chromatogramie przedstawionym na rysunku 3b są widoczne przeładowania stężeniowe układu chromatograficznego, wszelako świadczące o większej efektywności zastosowanej metody ekstrakcyjnej, niż w tych przypadkach, gdzie takich przeładowań stężeniowych nie zaobserwowano.

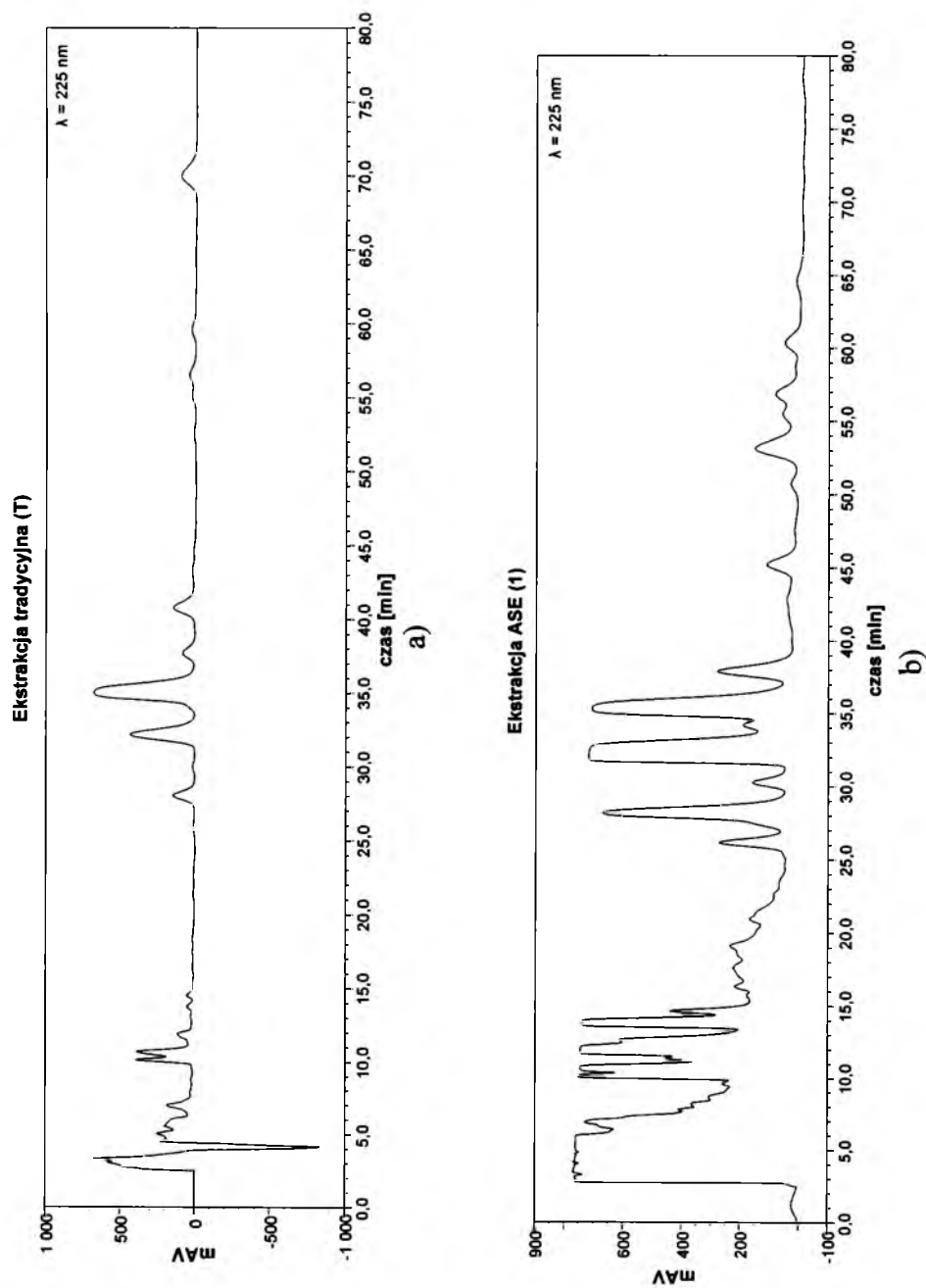
Również na podstawie wyników uzyskanych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej za najefektywniejszą metodę ekstrakcji uznano metodę ASE

(1), wykorzystującą jako rozpuszczalniki kolejno n-heksan i metanol (Rys. 3b). Dodatkowymi zaletami zastosowanej metody ekstrakcji są krótki czas jej prowadzenia oraz stosunkowo niewielka ilość użytych rozpuszczalników.

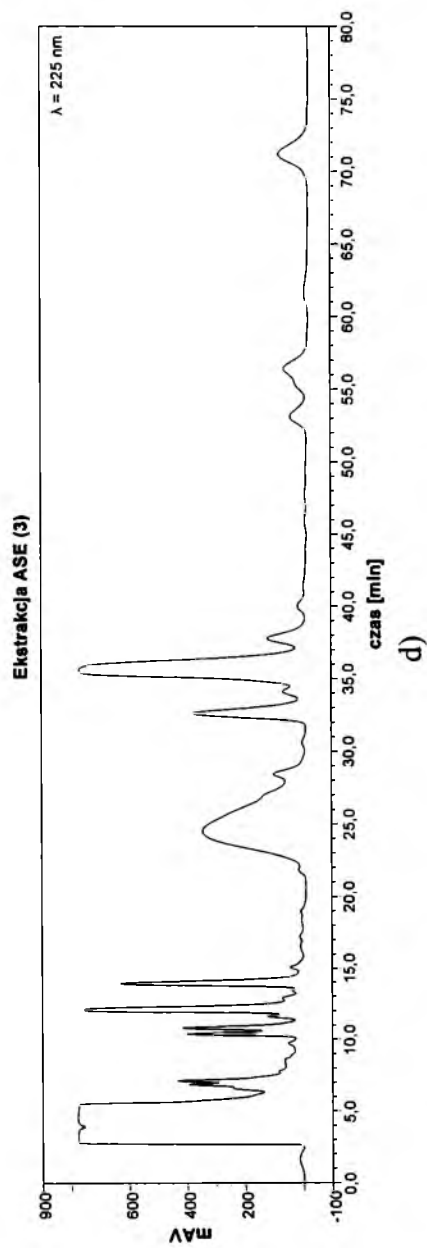
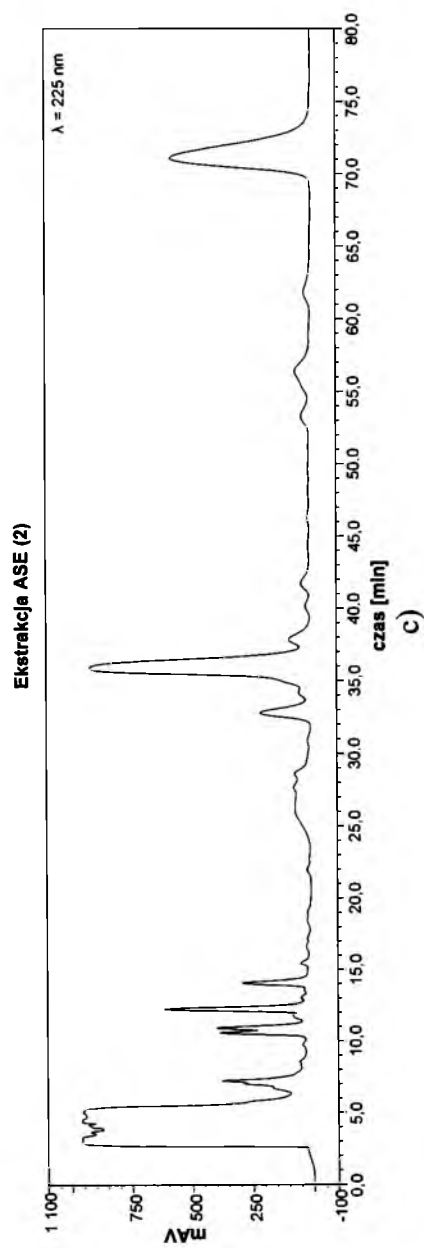
W celu pełniejszego rozpoznania składu chemicznego rozpatrywanych ekstraktów szalwii, również w przypadku techniki HPLC przeprowadzono analizę identyfikacyjną metanolowego ekstraktu szalwii ASE (1) z wykorzystaniem wzorców związków fenolowych, która umożliwiła identyfikację następujących substancji: kwasu *o*-kumarowego, kwasu kawowego, kwasu *trans*-cynamonowego, apigeniny, rutyny, kemferolu oraz mirycetyny. Identyfikację tę przeprowadzono na podstawie porównania czasów retencji (t_R) oraz widm UV dla substancji wzorcowych oraz dla odpowiednich składników, widocznych na chromatogramie badanego ekstraktu. W tabeli 15 przedstawiono fragmenty chromatogramów wraz z widmami UV zidentyfikowanych substancji.

Większa rozdzielczość oraz odmienne warunki prowadzenia rozdziału chromatograficznego podczas analizy wykonanej techniką HPLC pozwoliły na uzupełnienie i poszerzenie informacji na temat przeprowadzonych metod ekstrakcji oraz na identyfikację większej liczby składników zawartych w badanych ekstraktach szalwii, niż to było możliwe w przypadku analizy wykonanej techniką TLC. Niemniej dzięki technice TLC połączonej z detekcją densytometryczną zidentyfikowano glukozyd apigeniny oraz kwas ferulowy, czego nie udało się osiągnąć wykorzystując technikę HPLC/DAD.

Opierając się na różnicy w warunkach i rezultatach prowadzenia rozdziału chromatograficznego technikami TLC i HPLC, postanowiono połączyć obie te techniki, stosując w tym celu preparatywną chromatografię cienkowarstwową (PLC) sprzężoną z wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC/DAD).

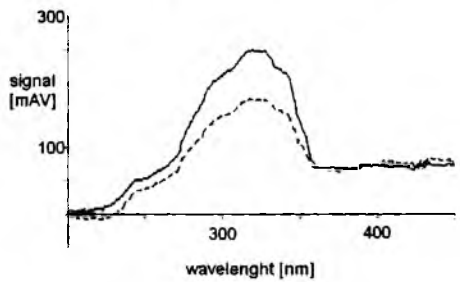
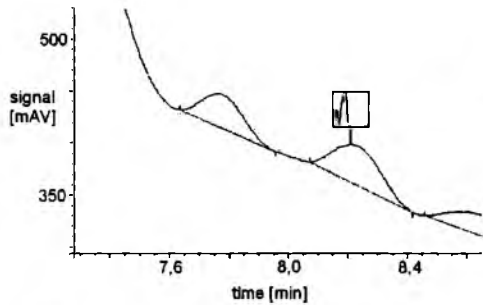
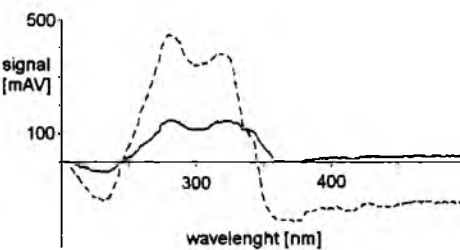
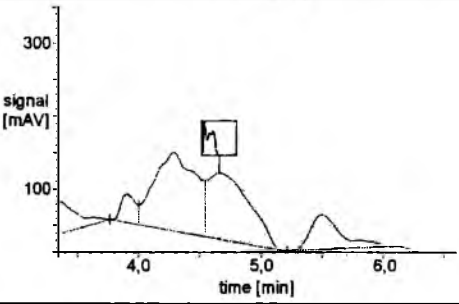
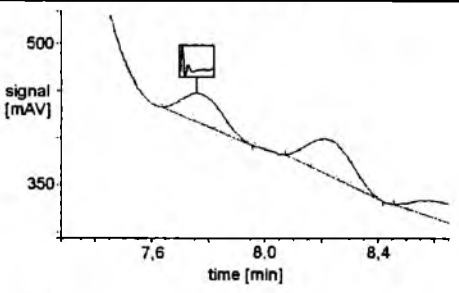
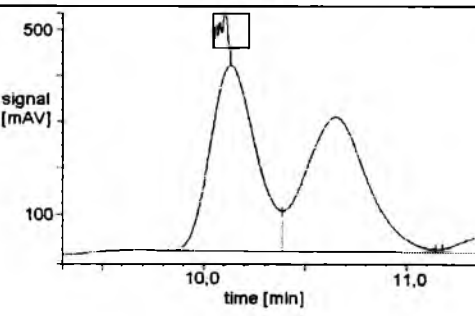
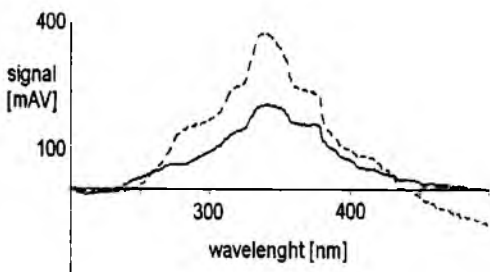


Rys. 3. Chromatogramy ekstraktu szatwii lekarskiej (*S. officinalis*), wykonane metodą a) tradycyjną (T), b) ASE (1). Kolumna: RP-18. Faza ruchoma: acetonitryl + woda, 55 : 45 (v/v) z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego. Prędkość przepływu fazy ruchomej: 0,6 ml/min. Czas trwania analizy: 80 min. Rejestracja chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 225 \text{ nm}$. Ekstrakty dozowano w ilości 40 μl .

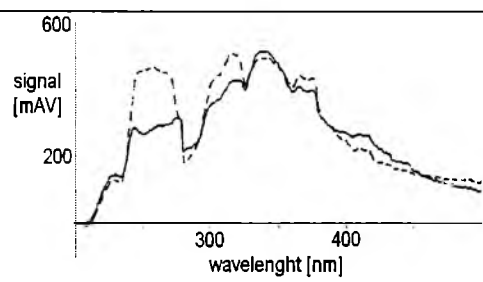
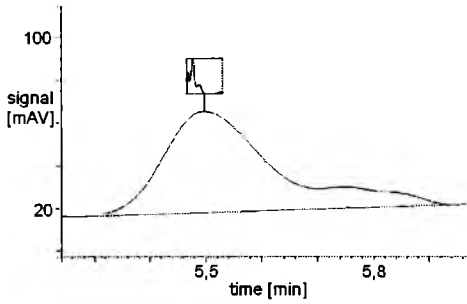
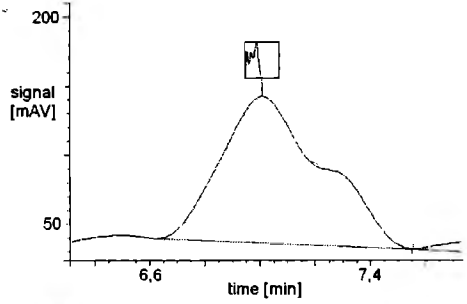
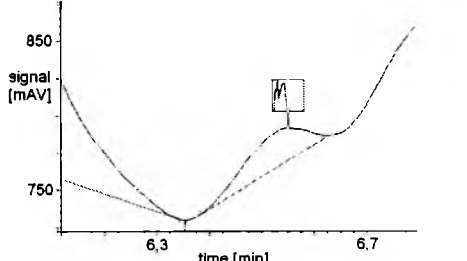


Rys. 3. (c.d.) Chromatogramy ekstraktu szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) wykonane metodą c) ASE (2), d) ASE (3). Kolumna: RP-18. Faza ruchoma: acetonitryl + woda, 55 : 45 (v/v) z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego. Prędkość przepływu fazy ruchomej: 0,6 ml/min. Czas trwania analizy: 80 min. Rejestracja chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 225$ nm. Ekstrakty dozowano w ilości 40 μ l.

Tab. 15. Zidentyfikowane substancje czynne występujące w szalwii lekarskiej (*S. officinalis*). Dla techniki HPLC/DAD przedstawiono fragmenty chromatogramów wraz z widmami UV, umieszczonymi w „okienkach” nad odpowiednimi pikami. Dla techniki TLC/densytometria linią ciągłą zaznaczono zarejestrowane *in situ* widmo UV próbki, zaś linią przerywaną zarejestrowane *in situ* widmo UV wzorca.

Substancja wzorcowa	HPLC/DAD	TLC/densytometria
Kwas ferulowy	nie zidentyfikowano	
Kwas o-kumarowy		
Kwas kawowy		nie zidentyfikowano
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy		nie zidentyfikowano
Apigenina		

Tab. 15. (c.d.)

Substancja wzorcowa	HPLC/DAD	TLC/densytometria
Glukozyd apigeniny	nie zidentyfikowano	
Rutyna		nie zidentyfikowano
Kemferol		nie zidentyfikowano
Mirycetyna		nie zidentyfikowano

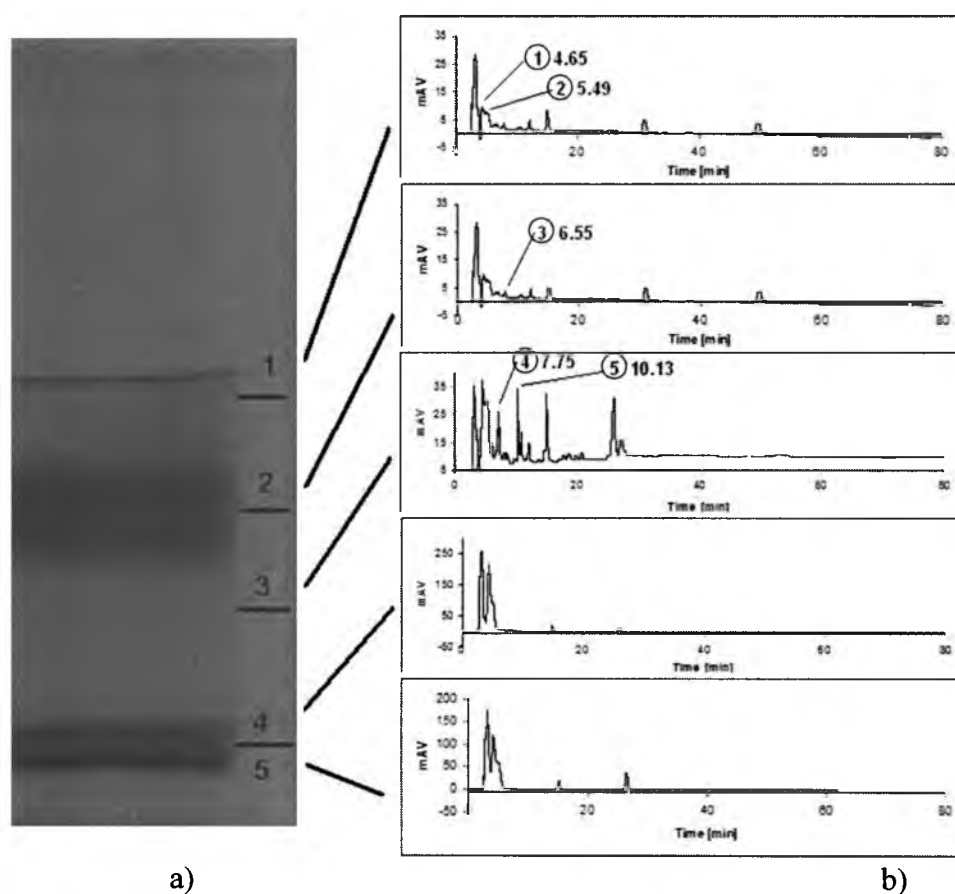
3.1.3. Analiza wybranego ekstraktu szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) techniką preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PLC)

Kierując się wcześniej wzmiankowanym zamierzeniem, przeprowadzono rozdział składników metanolowego ekstraktu uzyskanego metodą ASE (1) techniką preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej (PLC), stosując analogiczne warunki prowadzenia rozdziału, jak w przypadku analitycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Również w tym przypadku jako fazę stacjonarną użyto żel krzemionkowy, a jako fazę ruchomą mieszaninę toluenu i 1,4-dioksanu w stosunku objętościowym 7 : 2.

Jak to zostało przedstawione na wideoskaniu chromatogramu uzyskanego techniką PLC (Rys. 4a), badany ekstrakt szalwii udało się podzielić na pięć frakcji, które po wyodrębnieniu poddano dalszej analizie techniką HPLC/DAD. Uzyskane dla poszczególnych frakcji chromatogramy HPLC pokazano również na tym samym

rysunku. Uwzględniając czasy retencji oraz widma UV zastosowanych wzorców, w analizowanych frakcjach udało się zidentyfikować kwas kawowy (1), rutynę (2), mirycetynę (3), kwas *trans*-cynamonowy (4) oraz apigeninę (5), co odpowiednio zaznaczono na chromatogramach (Rys. 4b).

Jak wynika z chromatogramów HPLC przedstawionych na rysunku 4a, wyodrębnione frakcje różnią się między sobą tak pod względem składu jakościowego, jak i ilościowego. Wstępne rozseparowanie bogatego w związki aktywne ekstraktu szalwii techniką PLC na poszczególne frakcje ułatwia jego dalszą analizę, jest jednak kosztowne i pracochłonne. Niestety, mimo połączenia obu technik chromatograficznych (PLC i HPLC/DAD), na chromatogramach pięciu wyodrębnionych frakcji nie zidentyfikowano kwasu ferulowego ani glukozydu apigeniny. Z wyżej wymienionych przyczyn zaniechano więc optymalizacji przedstawionej niniejszym procedury, złożonej ze wstępnego rozdziału substancji zawartych w metanолоwych ekstraktach szalwii techniką PLC, preparatywnego wyodrębnienia składników poszczególnych frakcji z planarnego złoża oraz analizy składu poszczególnych frakcji techniką HPLC/DAD.



Rys. 4. a) Wideoskan chromatogramu metanолоwego ekstraktu szalwii lekarskiej (*S. officinalis*). Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Rejestracja videoskanu przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm. b) Porównanie chromatogramów cieczowych pięciu wyodrębnionych frakcji. Kolumna: RP-18. Faza ruchoma: acetonitryl + woda, 55 : 45 (v/v) z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego. Prędkość przepływu fazy ruchomej: 0,6 ml/min. Czas trwania analizy: 80 min. Rejestracja chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 225$ nm. Umieszczone na chromatogramach numery odpowiadają zidentyfikowanym w poszczególnych frakcjach substancjom: (1) kwas kawowy, (2) rutyna, (3) mirycetyna, (4) kwas *trans*-cynamonowy oraz (5) apigenina. Każdą frakcję dozowano w ilości 40 μ l.

3.2. Analiza metanolowych ekstraktów szalwii techniką chromatografii cienkowarstwowej

Szałwia lekarska (*S. officinalis*) jest jednym spośród około 900 gatunków, który jako jeden z nielicznych znalazł powszechne zastosowanie w ziołolecznictwie [115]. Jedną z przyczyn tego, że większość pozostałych gatunków szalwii nie została dotychczas uznana za rośliny lecznicze jest brak dokładnych badań dotyczących składu oraz działania zawartych w nich substancji czynnych. Systematyczna analiza składu chemicznego różnych gatunków szalwii i porównanie go ze składem chemicznym szalwii lekarskiej może pomóc w znalezieniu nowych surowców leczniczych. Jednocześnie analiza ta pozwala na wytypowanie markerów oraz pomocniczych wskaźników chemotaksonomicznych, a co za tym idzie, na ulepszenie systematyki roślin.

W niniejszej pracy skupiono się na analizie jakościowej i ilościowej związków fenolowych, tj. kwasów fenolowych i flawonoidów, obecnych w ekstraktach dwudziestu sześciu gatunków szalwii przedstawionych w tabeli 16.

Tab. 16. Wykaz gatunków szalwii poddanych analizom techniką TLC

Nr	Gatunek szalwii	Nr	Gatunek szalwii
1	<i>S. amplexicaulis</i>	15	<i>S. triloba</i>
2	<i>S. azurea</i>	16	<i>S. verticillata</i>
3	<i>S. cadmica</i>	17	<i>S. officinalis</i>
4	<i>S. deserta</i>	18	<i>S. lavandulifolia</i>
5	<i>S. forskahlei</i>	19	<i>S. atropatana</i>
6	<i>S. glutinosa</i> ^a	20	<i>S. canariensis</i>
7	<i>S. hians</i>	21	<i>S. argentea</i>
8	<i>S. jurisicii</i>	22	<i>S. austriaca</i>
9	<i>S. nemorosa</i>	23	<i>S. nutans</i>
10	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	24	<i>S. regeliana</i>
11	<i>S. sclarea</i>	25	<i>S. superba</i>
12	<i>S. staminea</i>	26	<i>S. glutinosa</i>
13	<i>S. stepposa</i>	27	<i>S. officinalis</i> ^b
14	<i>S. tesquicola</i>	28	<i>S. pratensis</i>

^a ze stanowiska naturalnego w Ostrowsku, Polska

^b ze stanowiska naturalnego w Zlatiborze, Serbia

Zawężenie obszaru badań do związków fenolowych było spowodowane kilkoma czynnikami, m. in. dużą ilością analizowanych gatunków oraz obecnością tych związków w ekstraktach z różnych gatunków rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae*), co niewątpliwie czyni tę grupę jedną z charakterystycznych i ważnych dla tej rodziny. Przykładem może być m. in. obecność kwasu rozmarynowego w większości roślin należących do rodziny jasnotowatych, do której należy również szalwia [115]. Na uwagę zasługuje także fakt, iż w lecznictwie wykorzystuje się wodne napary lub odwary sporządzane z liści szalwii, zatem do wyciągów przechodzą związki dobrze rozpuszczalne w wodzie, którymi są m.in. polarne glikozydy i aglikony flawonoidów oraz kwasy organiczne i kwasy fenolowe. Ponadto wysoka aktywność biologiczna związków fenolowych została potwierdzona w licznych badaniach klinicznych,

w których wykazały one m.in. działanie antyosydacyjne, przeciwwkrzepliwe, antykancerogenne, czy przeciwwirusowe.

Literatura zaleca, aby konstruując fingerprinty skoncentrować się na badaniu jedynie tych substancji, które są charakterystyczne dla danego gatunku lub gatunków, pomijając te, które są powszechnie obecne w świecie roślinnym [116]. Szczególnym przypadkiem tworzenia charakterystycznych odcisków palca są blisko spokrewnione gatunki roślin, które mogą się nieznacznie różnić składem chemicznym i wówczas nawet najmniejsze różnice mogą mieć istotny wpływ na ustalenie relacji międzygatunkowych. W niniejszej pracy badano różne, spokrewnione ze sobą gatunki szalwii, dlatego zastosowanie w pierwszym etapie badań metanolu jako ekstrahenta okazało się trafnym wyborem, gdyż uzyskane metanolowe ekstrakty zawierały substancje o szerokim spektrum polarności.

Najistotniejsze w analizie fingerprintów jest badanie materiału roślinnego pozyskanego z wiarygodnego źródła. Aby uzyskać właśnie takie surowce wszystkie gatunki szalwii (*Salvia*) analizowane w przedstawionych eksperymentach były uprawiane w tych samych warunkach, w Ogrodzie Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Ponadto poddano je identycznej procedurze suszenia.

Jako, że ekstrakty roślinne to zazwyczaj bardzo złożone próbki, trudnym lub prawie niemożliwym staje się znalezienie jednego układu chromatograficznego, pozwalającego na zadowalający rozdział ich składników. W zdecydowanej większości opublikowanych metod chromatograficznych, tworzenie fingerprintów opiera się na pojedynczym chromatogramie. Takie podejście okazuje się jednak niewystarczające w obliczu tak skomplikowanych próbek, jakimi są ekstrakty pochodzenia naturalnego [117]. Z tego powodu niektórzy autorzy proponują połączenie kilku metod analitycznych opierających się na różnych zasadach rozdziału [118]. Z kolei w innych pozycjach literaturowych, jako korzystne rozwiązanie znaleźć można propozycje tworzenia wielu chromatograficznych odcisków palca („multiple chromatographic fingerprints”) [117]. Techniki łączone, jak między innymi HPLC-MS, LC×LC i HPLC-NMR także dostarczają wielu informacji i znajdują zastosowanie w analizie roślin [119, 120]. Wszystkie proponowane metody mogą zapewnić wiarygodne wyniki, jednakże ich tworzenie oraz interpretacja otrzymanych wyników nie należy do trywialnych zadań. Poza tym stosowanie technik łączonych oraz różnych kombinacji metod analitycznych wymaga wykorzystania zaawansowanego sprzętu, podczas, gdy konstrukcję wielu fingerprintów można z powodzeniem przeprowadzić stosując technikę chromatografii cienkowarstwowej (TLC). W niniejszym rozdziale przedstawiono wybrane metody konstrukcji charakterystycznych fingerprintów dla różnych gatunków szalwii.

Do eksperymentu użyto metanolowych ekstraktów dwudziestu gatunków szalwii uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej (zebranych w latach 2007 i 2008).

3.2.1. Analiza metanolowych ekstraktów szalwii techniką jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej

Pierwszym krokiem w analizie metanolowych ekstraktów dwudziestu gatunków szalwii było zastosowanie techniki jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej do konstrukcji charakterystycznych odcisków palca, czyli fingerprintów. Wykaz badanych gatunków wraz z odpowiadającymi im numerami umieszczono w tabeli 17. Niestety, bogaty skład metanolowych ekstraktów szalwii uniemożliwia znalezienie jednego, optymalnego układu chromatograficznego, który

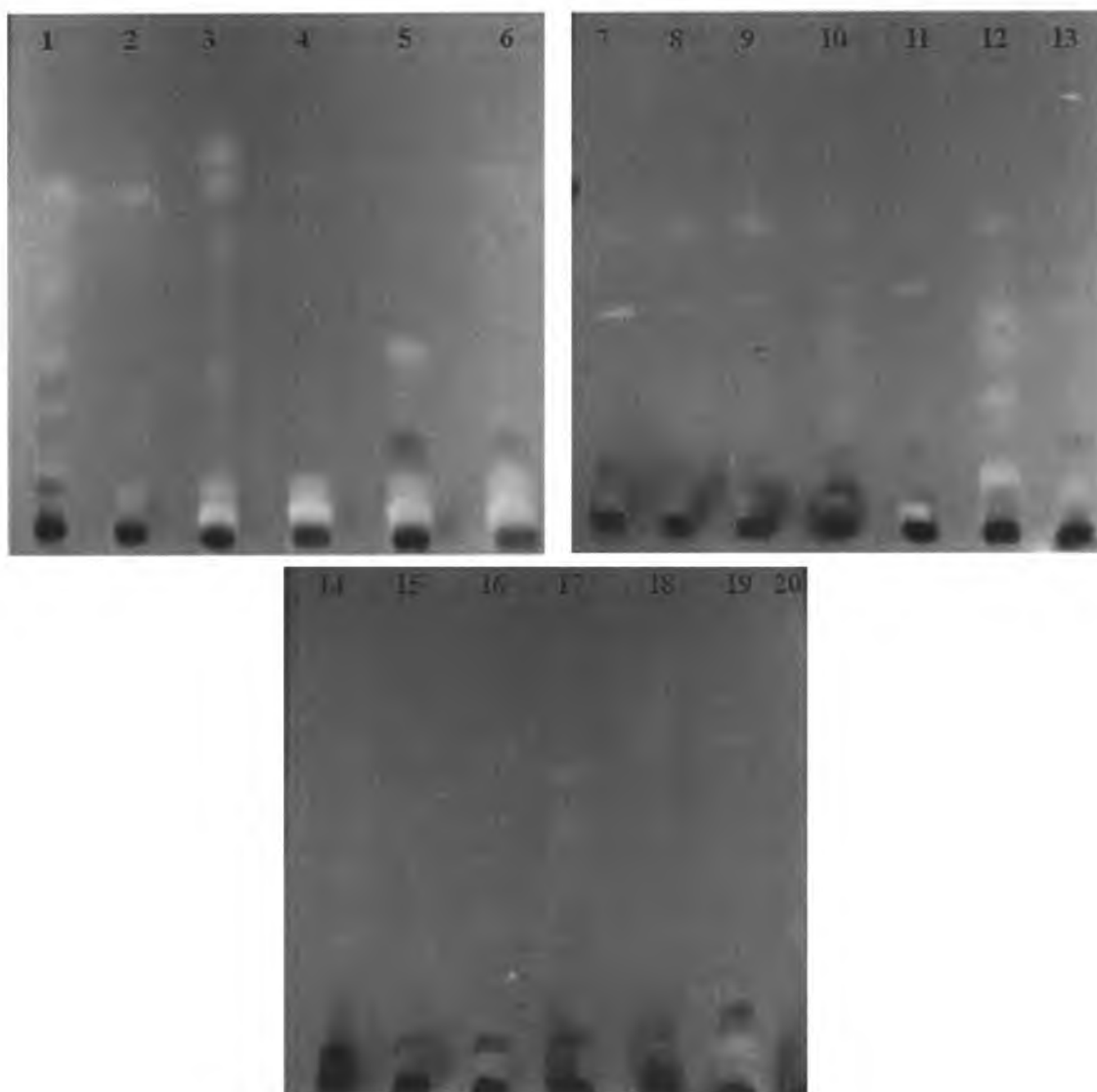
pozwoili by rozdzielić wszystkie substancje obecne w ekstraktach. Z tego wzgldu zdecydowano si na porównanie frakcji zwizków o rónej polarnoci, poprzez tworzenie wielu fingerprintów (ang. - multiple chromatographic fingerprinting). Jako pierwsz porównano frakcj o najmniejszej polarnoci. W tym celu metanолоwe ekstrakty dwudziestu gatunków szałwii (zebranych w 2007 roku) rozwinięto na żelu krzemionkowym z wykorzystaniem mieszaniny octanu etylu i toluenu w stosunku objętościowym 5 : 95. We frakcji o najmniejszej polarnoci znajdują się substancje lotne, które są obecne również w olejkach eterycznych. Obecność nisko polarnych zwizków organicznych potwierdzono stosując uniwersalny odczynnik derywatyzujący, którym był metanолоwy roztwór kwasu siarkowego(VI). Płytki spryskane odczynnikiem wywołującym ogrzewano w suszarce w temperaturze 105°C. Rejestracja wideoskanu została wykonana przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Zdjęcia otrzymanych chromatogramów przedstawiono na rysunku 5.

Tab. 17. Wykaz badanych gatunków szałwii wraz z odpowiadającymi im numerami

Nr	Gatunek	Nr	Gatunek
1	<i>S. officinalis</i>	11	<i>S. amplexicaulis</i>
2	<i>S. sclarea</i>	12	<i>S. lavandulifolia</i>
3	<i>S. azurea</i>	13	<i>S. glutinosa</i>
4	<i>S. pratensis</i>	14	<i>S. triloba</i>
5	<i>S. stepposa</i>	15	<i>S. jurisicii</i>
6	<i>S. deserta</i>	16	<i>S. cadmica</i>
7	<i>S. hians</i>	17	<i>S. atropatana</i>
8	<i>S. verticilatta</i>	18	<i>S. canariensis</i>
9	<i>S. staminea</i>	19	<i>S. tesquicola</i>
10	<i>S. nemorosa</i>	20	<i>S. forskaohlei</i>

W zastosowanym układzie chromatograficznym charakterystyczne chromatogramy otrzymano dla następujących gatunków szałwii: *S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. azurea*, *S. pratensis*, *S. stepposa*, *S. deserta*, *S. lavandulifolia* oraz *S. glutinosa*, oznaczonych na rysunku 12 numerami od 1 do 6 oraz 12 i 13.

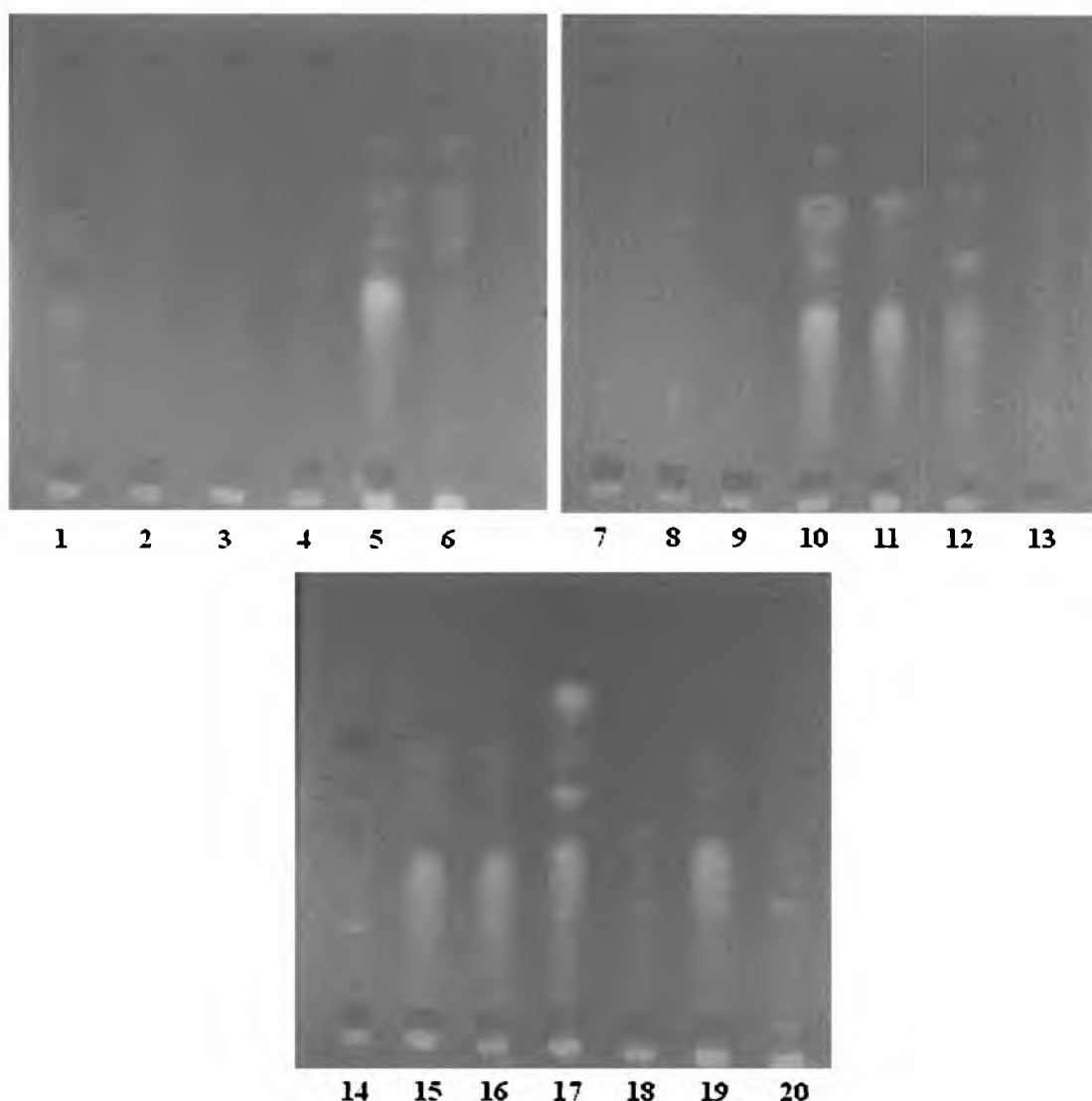
Porównanie fingerprintów najmniej polarnej frakcji metanолоwych ekstraktów powinno umożliwić określenie różnic w składzie chemicznym badanych gatunków szałwii. Niestety, dla następujących gatunków szałwii: *S. hians*, *S. verticilatta*, *S. staminea*, *S. nemorosa* i *S. amplexicaulis*, oznaczonych numerami od 7 do 11 uzyskano bardzo podobne chromatogramy, na których dominują dwa jasne pasma o współczynniku retardacji (R_F) w zakresie 0,50-0,65.



Rys. 5. Zdjęcia chromatogramów metanolowych ekstraktów dwudziestu gatunków szalwii. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: octanu etylu + toluen, 5 : 95 (v/v). Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: 10% metanolowy roztwór H_2SO_4 . Rejestracja chromatogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery odpowiadają poszczególnym gatunkom szalwii, jak podano w tabeli 17. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .

Chromatogramy gatunków *S. triloba*, *S. jurisicii*, *S. cadmica*, *S. atropatana*, *S. canariensis*, *S. tesquicola* oraz *S. forskaohlei* (oznaczonych numerami 14-20) są mało charakterystyczne, a rozdzielone pasma prawie niewidoczne.

Brak charakterystycznych fingerprintów w przypadku najmniej polarnej frakcji pochodzącej od kilku gatunków szalwii sprawił, iż w kolejnym kroku analizy podjęto badania nad bardziej polarnymi frakcjami. Ekstrakty metanolowe rozwijano więc na płytkach pokrytych żelalem krzemionkowym z zastosowaniem mieszaniny rozpuszczalników o większej sile elucyjnej, której składnikami były octan etylu, toluen i kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 70 : 30 : 1. W tym przypadku jako odczynnik wywołujący zastosowano metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja chromatogramu została również wykonana przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Zdjęcia uzyskanych chromatogramów przedstawiono na rysunku 6.

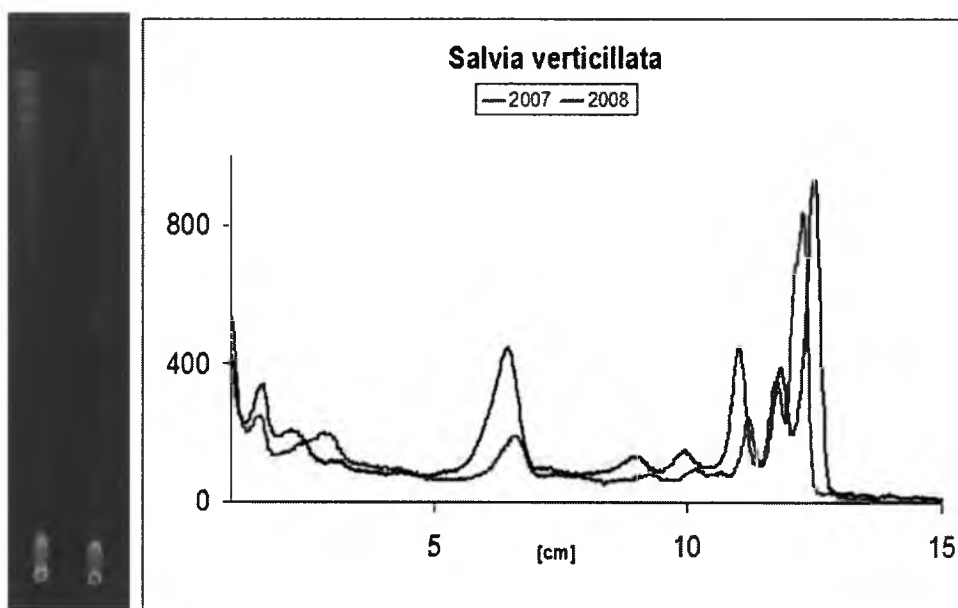


Rys. 6. Zdjęcia chromatogramów metanolowych ekstraktów dwudziestu gatunków szalwii. Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: octanu etylu + toluen + kwas mrówkowy, 70 : 30 : 1 (v/v). Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór AlCl₃. Rejestracja chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Numery odpowiadają poszczególnym gatunkom szalwii, jak podano w tabeli 17. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.

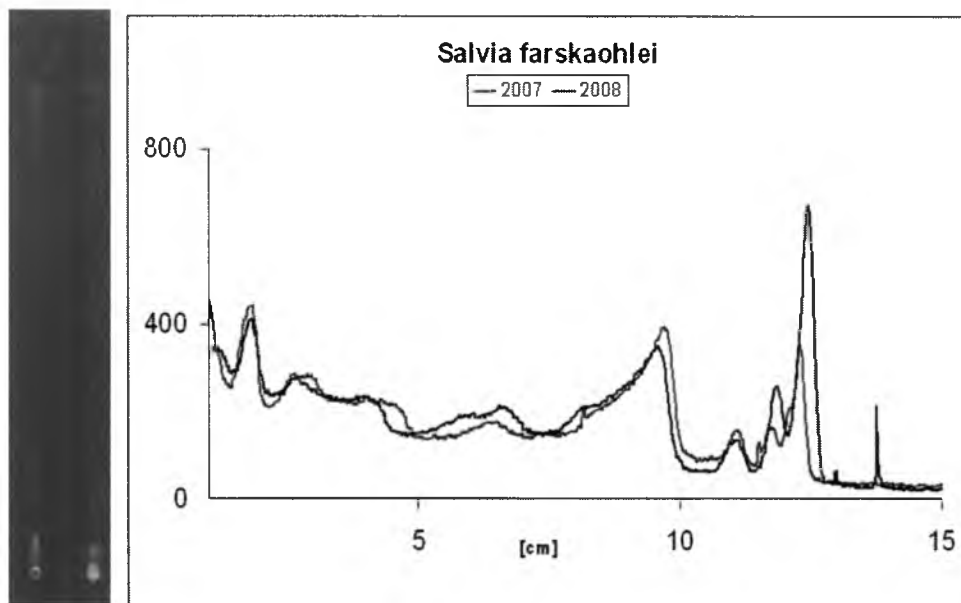
Analiza otrzymanych chromatogramów umożliwiła jedynie częściowe ustalenie różnic między porównywanymi gatunkami szalwii. Podobnie, jak w poprzednim przypadku, w zastosowanym układzie chromatograficznym kilka spośród analizowanych gatunków szalwii tworzy bardzo podobne fingerprinty. To podobieństwo chromatogramów dotyczy gatunków *S. stepposa* (5), *S. nemorosa* (10), *S. amplexicaulis* (11), *S. lavandulifolia* (12), *S. jurisicii* (15), *S. cadmica* (16), *S. atropatana* (17) oraz *S. tesquicola* (19). W wymienionych gatunkach charakterystycznym składnikiem ekstraktów jest kwas ferulowy, który na chromatogramach widoczny jest w postaci ogonującej niebieskiej plamki o współczynniku retardacji (R_F) równym około 0,40. Bliskie pokrewieństwo, a co często za tym idzie, zbliżony skład chemiczny badanych roślin, uniemożliwiły wykorzystanie zastosowanego układu chromatograficznego do konstrukcji charakterystycznych fingerprintów, ponieważ układ ten nie pozwala na znalezienie wyraźnych różnic między

dwudziestoma gatunkami szalwii. Podczas analizy otrzymanych chromatogramów na starcie zauważono nierozdzielone substancje, które mogłyby uzupełnić posiadaną informację o składzie chemicznym badanych roślin. Dodatkowym problemem, który utrudnia analizę fitochemiczną są stężenia poszczególnych substancji obecnych w ekstraktach, ponieważ część związków o mniejszych stężeniach może zostać zamaskowana substancjami występującymi w większych stężeniach.

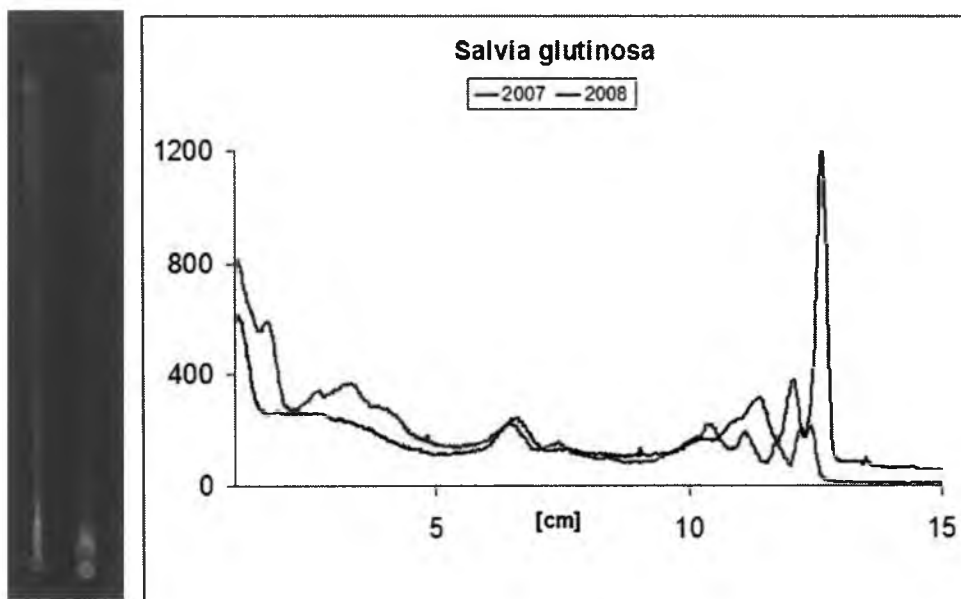
Kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy odcisków palca wybranych gatunków szalwii techniką jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną. Zastosowana detekcja miała pozwolić na lepsze ustalenie różnic między badanymi gatunkami szalwii. Jako fazę stacjonarną wykorzystano żel krzemionkowy, a eluentem była mieszanina toluenu i 1,4-dioksanu w stosunku objętościowym 7 : 2. Tym razem płytki wywołano roztworem boranu 2-aminoetylodifenyłowego i utrwalono roztworem PEG 4000. Rysunki 7-12 zawierają sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów sześciu gatunków szalwii (*S. verticillata*, *S. farskaohlei*, *S. lavandulifolia*, *S. glutinosa*, *S. stepposa* oraz *S. azurea*). Profile stężeniowe ekstraktów *S. verticillata* oraz *S. farskaohlei* wykazują sezonowe podobieństwo zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym (Rys. 7 i 8). Prawidłowość ta nie dotyczy jednak wszystkich densytogramów, gdyż dla gatunków *S. glutinosa* oraz *S. lavandulifolia* (Rys. 9 i 10) zauważono jedynie podobieństwo pod względem jakościowym, a w pozostałych dwóch przypadkach (Rys. 11 i 12) profile stężeniowe różnią się zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym.



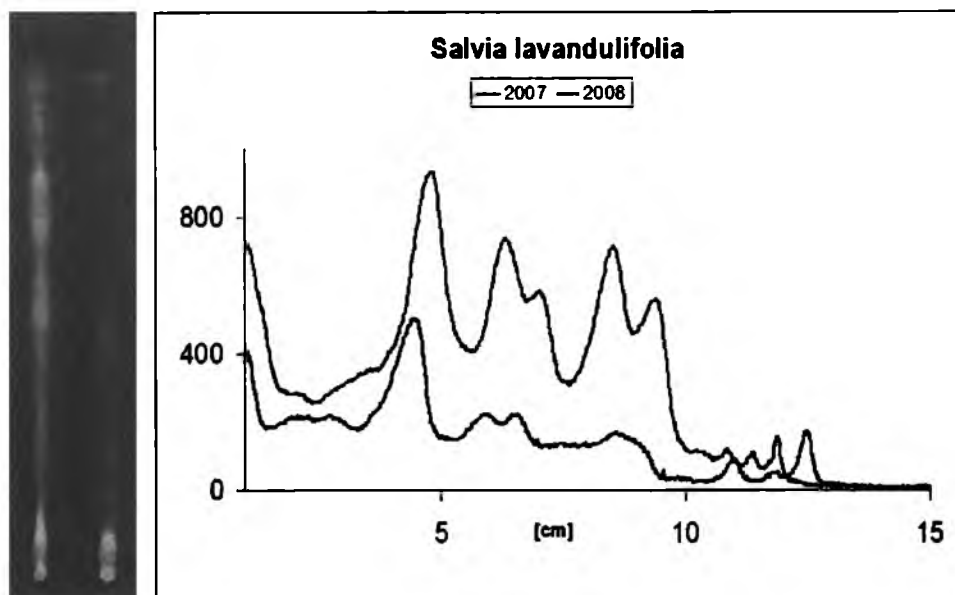
Rys. 7. Sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów *S. verticillata*. Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: metanolowy roztwór boranu 2-aminoetylodifenyłowego. Zdjęcie chromatogramu wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Rejestracja densytogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.



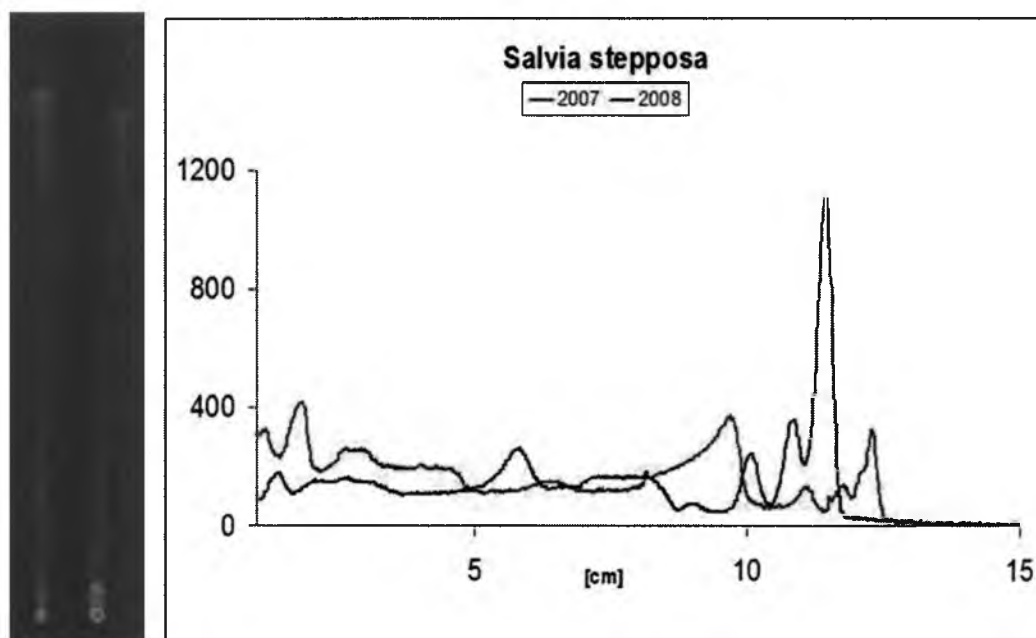
Rys. 8. Sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów *S. farskaohlei*. Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15cm. Odczynnik wywołujący: metanolowy roztwór boranu 2-aminoetylodifenyłowego. Zdjęcie chromatogramu wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Rejestracja densytogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.



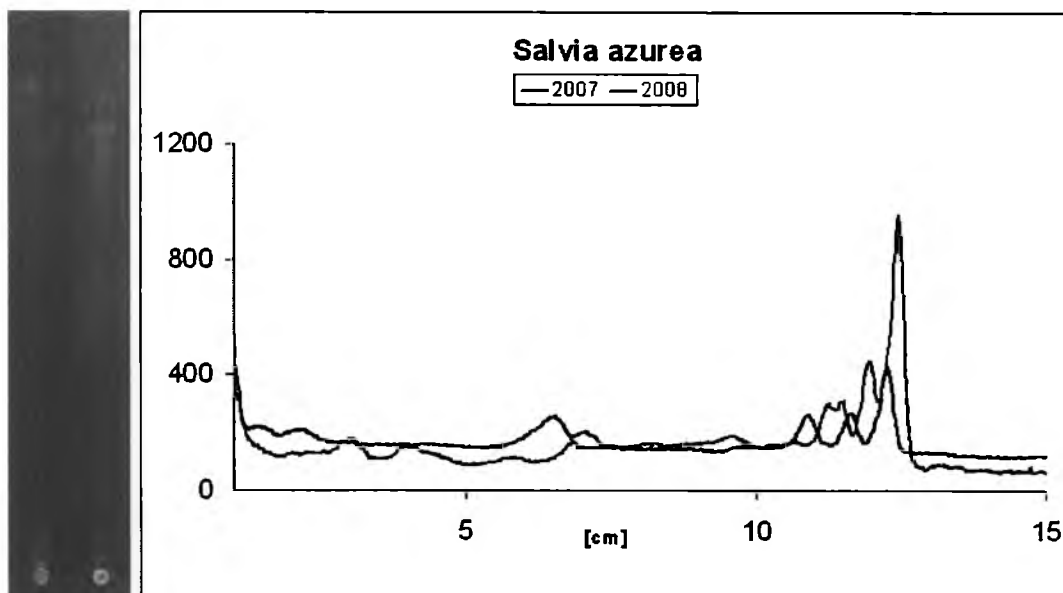
Rys. 9. Sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów *S. glutinosa*. Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: metanolowy roztwór boranu 2-aminoetylodifenyłowego. Zdjęcie chromatogramu wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Rejestracja densytogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.



Rys. 10. Sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów *S. lavandulifolia*. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15cm. Odczynnik wywołujący: metanolowy roztwór boranu 2-aminoetylodifenyłowego. Zdjęcie chromatogramu wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Rejestracja densytogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .



Rys. 11. Sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów *S. stepposa*. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15cm. Odczynnik wywołujący: metanolowy roztwór boranu 2-aminoetylodifenyłowego. Zdjęcie chromatogramu wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Rejestracja densytogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .



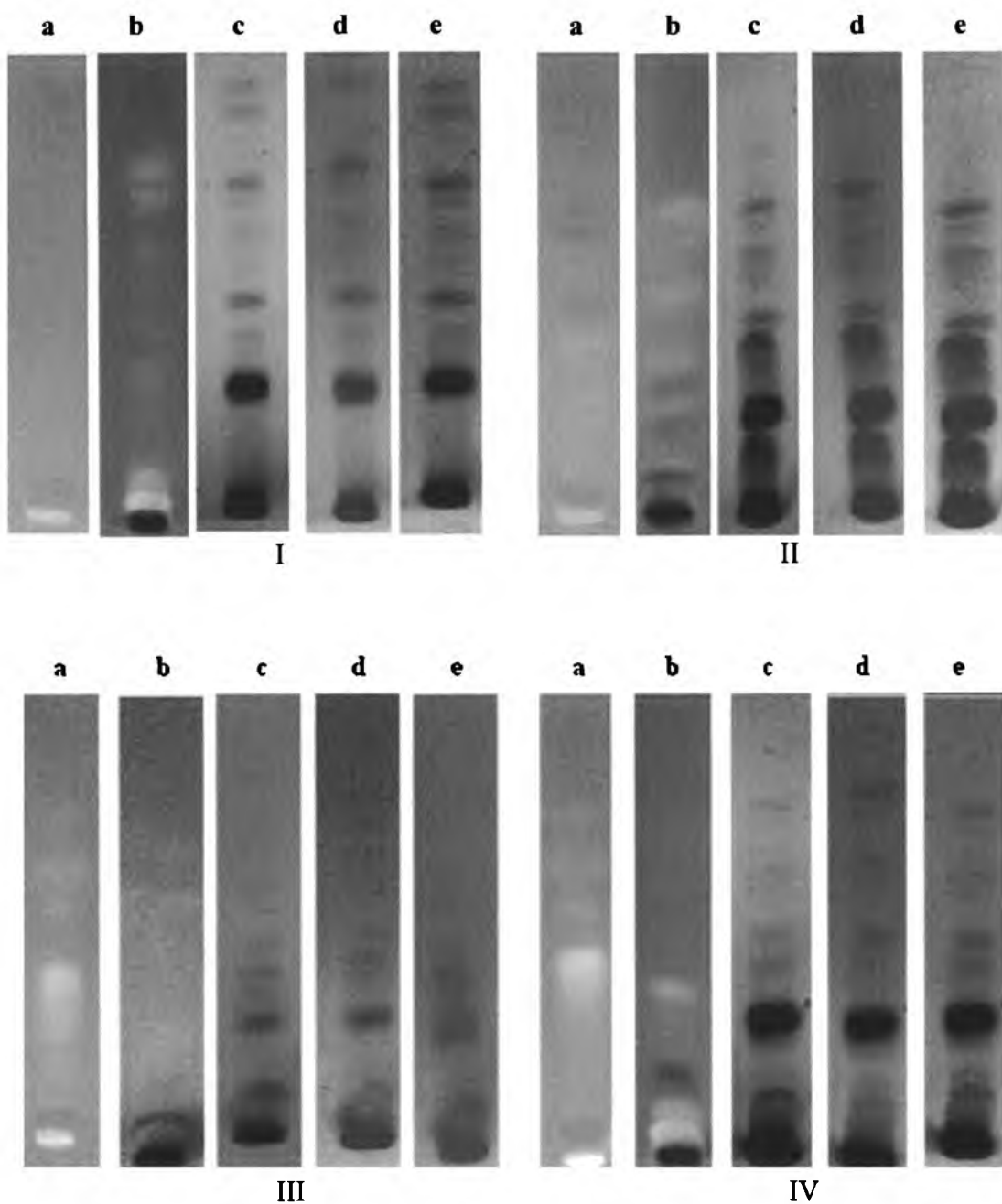
Rys. 12. Sezonowe porównanie chromatogramów i densytogramów metanolowych ekstraktów *S. azurea*. Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: toluen + 1,4-dioksan, 7 : 2 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: metanolowy roztwór boranu 2-aminoetylodifenyłowego. Zdjęcie chromatogramu wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Rejestracja densytogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.

Wpływ na uzyskane wyniki mają liczne czynniki, m.in. takie, jak nasłonecznienie, opady czy czas zbioru roślin. Niestety, analiza otrzymanych profili stężeniowych pozwala rozróżnić jedynie część analizowanych gatunków roślin. Podobnie, jak w poprzednich krokach analitycznych, część spośród badanych gatunków szalwii tworzy niemalże identyczne fingerprinty w podanym układzie chromatograficznym, co uniemożliwia ich jednoznaczne rozróżnienie. Podobieństwo wykazują m.in. takie gatunki, jak *S. glutinosa*, *S. verticillata* oraz *S. stepposa*. Z powyższego względu łatwiej jest analizować różnice w składzie chemicznym roślin, dysponując kilkoma profilami chemicznymi danego gatunku, wykorzystując do tego celu różne układy chromatograficzne i/lub korzystając z różnych technik wywoływania chromatogramów.

W tym celu podjęto kolejny krok w analizie fingerprintów wybranych gatunków szalwii. Na rysunku 13 przedstawiono chromatogramy czterech gatunków szalwii (*S. azurea*, *S. officinalis*, *S. tesquicola* oraz *S. jurisicii*), które rozwijano w trzech układach chromatograficznych. Również i w tym przypadku fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy. Wszystkie chromatogramy były rozwijane na wysokość 9 cm. Fazy ruchome i odczynniki wywołujące przedstawiono w tabeli 18.

Tab. 18. Fazy ruchome, odczynniki wywołujące oraz długość fali, przy jakiej wykonano zdjęcia

Nr	Eluent (v/v)	Odczynnik wywołujący	Długość fali [nm]
a	toluen + octan etylu + kwas mrówkowy (70 + 30 + 1)	brak	366
b	toluen + octan etylu (5 + 95)	kwas siarkowy	366
c	toluen + octan etylu (15 + 85)	kwas siarkowy	światło widzialne
d	toluen + octan etylu (15 + 85)	kwas siarkowy	254
e	toluen + octan etylu (15 + 85)	kwas siarkowy	366



Rys. 13. Zdjęcia chromatogramów metanolowych ekstraktów czterech wybranych gatunków szalwii: (I) *S. azurea*, (II) *S. officinalis* (III) *S. tesquicola* i (IV) *S. jurisicii* rozwijanych w trzech układach chromatograficznych z zastosowaniem różnych technik wywoływania chromatogramów. Faza stacjonarna: SiO_2 . Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl . Fazy ruchome oraz odczynniki wywołujące podano w tabeli 18.

Analiza porównawcza kilku fingerprintów umożliwia znalezienie różnic między badanymi gatunkami roślin, nie mniej jednak tworzenie zestawu kilku chromatogramów dla jednego gatunku danej rośliny w porównaniu z analizą pojedynczych odcisków palca jest techniką wielce pracochłonną oraz czasochłonną.

Chcąc uzyskać jak najwięcej informacji z chromatogramów dla złożonych próbek wskazane jest, jak podaje literatura, tworzenie tzw. podwójnych fingerprintów, gdyż większa ilość danych o badanych próbkach umożliwia lepszą identyfikację poszczególnych substancji, a także oznacza większe prawdopodobieństwo znalezienia markerów chemotaksonomicznych oraz chemotaksonomicznych wskaźników pomocniczych. W prezentowanym eksperymencie podjęto próby konstrukcji fingerprintów dla frakcji związków polarnych i semi-polarnych zawartych w różnych gatunkach szalwii, przy czym głównie skupiono się na rozdzieleniu i identyfikacji związków fenolowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż po raz pierwszy na tak szeroką skalę wykorzystano technikę HPTLC do tworzenia charakterystycznych odcisków palca, umożliwiającą uchwycenie zarówno podobieństw jak i różnic w badanych gatunkach szalwii.

Gatunki szalwii, które poddano analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) przedstawiono w poniższej tabeli.

Tab. 19. Gatunki szalwii (*Salvia sp.*) oraz przyporządkowane im liczby porządkowe

Numer	Gatunek szalwii	Numer	Gatunek szalwii
1	<i>S. lavandulifolia</i>	11	<i>S. stepposa</i>
2	<i>S. sclarea</i>	12	<i>S. hians</i>
3	<i>S. tesquicola</i>	13	<i>S. officinalis</i>
4	<i>S. staminea</i>	14	<i>S. forskahlei</i>
5	<i>S. amplexicaulis</i>	15	<i>S. azurea</i>
6	<i>S. cadmica</i>	16	<i>S. verticillata</i>
7	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	17	<i>S. triloba</i>
8	<i>S. canariensis</i>	18	<i>S. deserta</i>
9	<i>S. nemorosa</i>	19	<i>S. glutinosa</i>
10	<i>S. jurisicii</i>	20	<i>S. atropatana</i>

Wszystkie badane ekstrakty szalwii poddano analizie jakościowej pod kątem obecności 29 związków fenolowych, przez porównanie wartości współczynnika retardacji (R_F), koloru poszczególnych pasm oraz widm UV-Vis substancji wzorcowych z danymi pochodzącymi od próbek. Niemniej jednak chcąc rzetelnie przeprowadzić analizę porównując otrzymane chromatogramy, brano również pod uwagę substancje, których nie zdołano zidentyfikować, gdyż nie jest to wymagane do konstrukcji i analizy fingerprintów. Zatem porównanie różnych gatunków szalwii przeprowadzono w oparciu o uzyskane chromatogramy HPTLC. Zastosowane substancje wzorcowe wymieniono w tabeli 20.

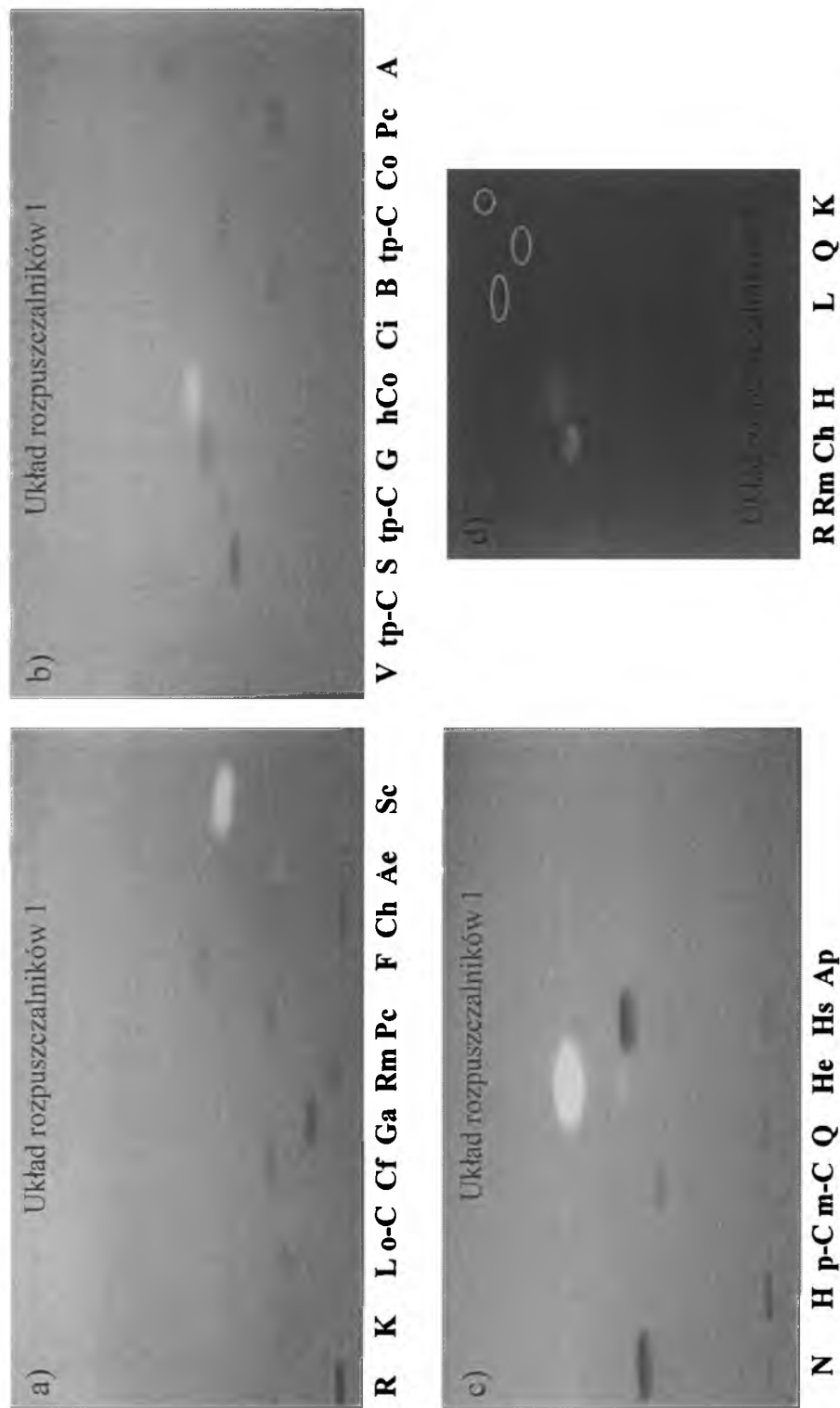
Tab. 20. Lista substancji wzorcowych wykorzystanych podczas analizy ekstraktów szafwii techniką wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej HPTLC

Substancja wzorcowa	Symbol substancji wzorcowej	Wartości R_F w układzie rozpuszczalników nr 1	Kolor po wywołaniu roztworem H_2SO_4 ($\lambda = 366\text{ nm}$)
Rutyna	R	0,0	Brązowy
Kemferol	K	0,09	Fioletowy
Luteolina	L	0,09	Fioletowy
Kwas o-kumarowy	o-C	0,22	Jasnopomarańczowy
Kwas kawowy	Cf	0,11	Granatowy
Kwas galusowy	Ga	0,06	Ciemnofioletowy
Kwas rozmarynowy	Rm	0,04	Ciemnofioletowy
Kwas protokatechowy	Pc	0,11	Fioletowy
Kwas ferulowy	F	0,22	Brązowy
Kwas chlorogenowy	Ch	0,0	Fioletowy
Eskuletyna	Ae	0,10	Niebieski
Skopoletyna	Sc	0,20	Niebieski
Kwas wanilinowy	V	nie wykryto przy $\lambda = 366\text{ nm}$	-
Kwas synapinowy	S	0,40	Fioletowy
Kwas <i>trans</i> -p-kumarowy	tp-C	0,42	Pomarańczowy
Kwas gentyzynowy	G	0,45	Brązowy
7-Hydroksykumaryna	hCo	0,47	Niebieski
Kwas cynamonowy	Ci	nie wykryto przy $\lambda = 366\text{ nm}$	-
Kwas 3,5-dihydroksybenzoesowy	B	0,25	Ciemnozielony
Kumaryna	Co	nie wykryto przy $\lambda = 366\text{ nm}$	-
Akacetyna	A	nie wykryto przy $\lambda = 366\text{ nm}$	-
Naringenina	N	0,44	Fioletowy
Hiperozyd	H	0,0	Brązowy
Kwas p-kumarowy	p-C	0,49	Różowy / brązowy*
Kwas m-kumarowy	m-C	0,41	Ciemnozielony
Kwercytyna	Q	0,0	Brązowy
Herniaryna	He	0,55	Niebieski
Hesperetyna	Hs	0,46	Fioletowy
Apigenina	Ap	nie wykryto przy $\lambda = 366\text{ nm}$	-
*Barwa pojawia się dopiero po pewnym czasie.			

Zastosowano dwa rodzaje faz ruchomych i w układzie rozpuszczalników (1) (toluen + octan etylu + kwas mrówkowy (70 : 30 : 1)) przeprowadzono rozdział oraz identyfikację nisko i średnio-polarnych substancji. Jednakże pewne bardziej polarne związki, takie jak rutyna, kwas chlorogenowy, hiperozyd oraz kwercytyna pozostały na starcie, co można zauważyć na rysunku 14. Dla tych związków zastosowano układ rozpuszczalników (2) (octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy (100 : 26 : 11 : 11)), który spowodował, iż mniej polarne związki zostały ściśnięte w pobliżu linii czoła fazy ruchomej, a bardziej polarne substancje uległy rozdziałowi. Zastosowanie tych dwóch różnych układów rozpuszczalników (dodatkowo w czterech różnych modyfikacjach każdy) pozwoliło na uzyskanie uzupełniających się i jednocześnie wyczerpujących informacji na temat badanego materiału roślinnego. Ponadto układy te umożliwiły rozdział związków fenolowych występujących w badanych gatunkach szalwii. Na chromatogramach zaobserwowano nakładanie się niektórych pasm, niemniej jednak osiągnięcie pełnego rozdziału nie jest konieczne do konstrukcji i analizy fingerprintów. Widoczny na chromatogramach kwas rozmarynowy (Rys. 18a-c) stał się granicą, swoistym przejściem między frakcją mniej i bardziej polarną, dzięki czemu połączenie chromatogramów obu frakcji pozwoliło na dostarczenie kompletu informacji o badanym materiale roślinnym.

Wiele fingerprintów dla jednej próbki można uzyskać stosując między innymi różne układy chromatograficzne, jednak ten sam cel można również osiągnąć stosując dla jednego chromatogramu różne metody detekcji, np. różne odczynniki wywołujące oraz rejestrację chromatogramów zarówno w zakresie światła widzialnego, jak i UV, jak to przedstawiono m. in. na rysunku 15.

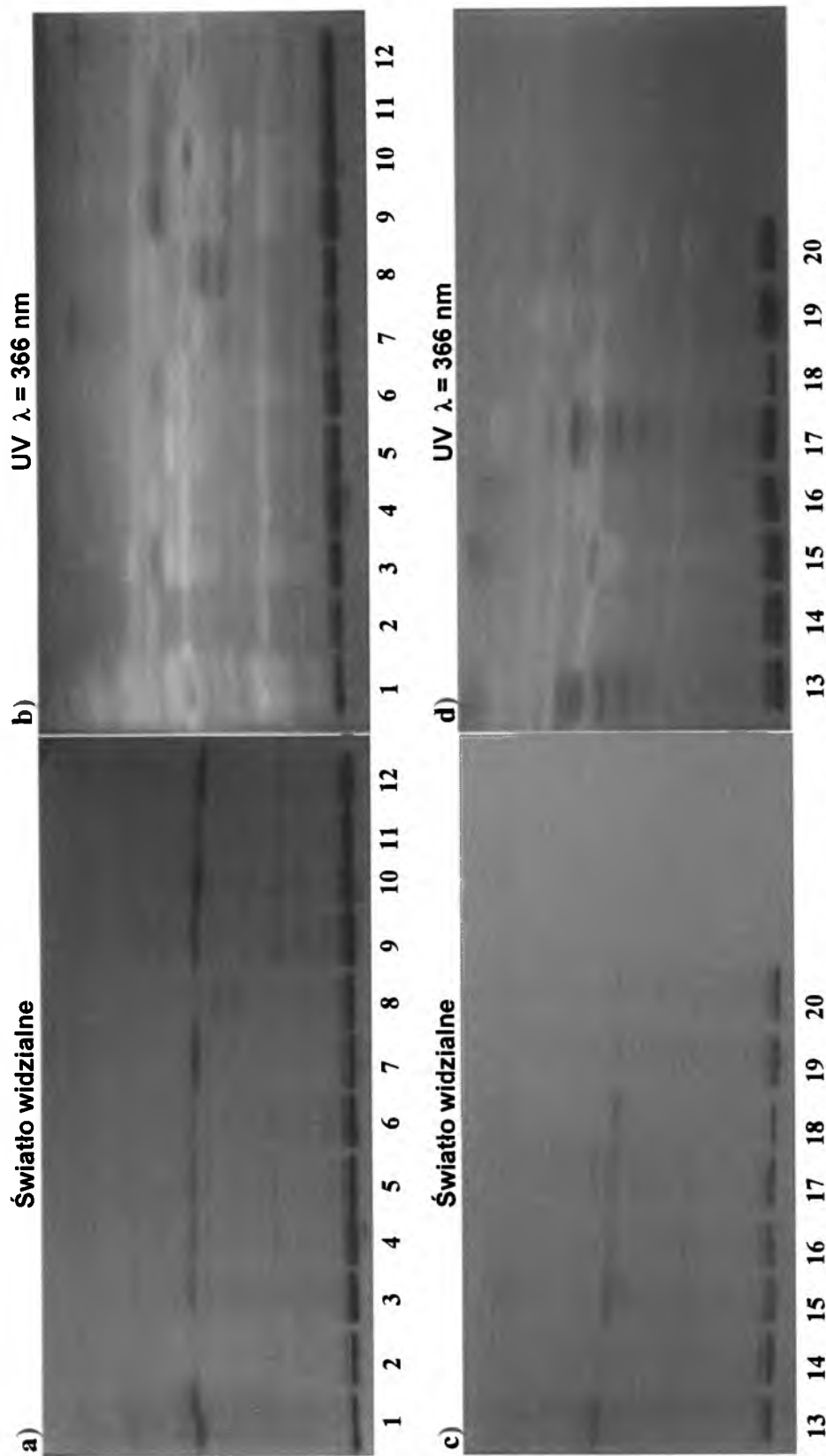
Zastosowanie powszechnie używanego odczynnika wywołującego, jakim jest roztwór chlorku glinu, spowodowało pojawienie się kilku niebieskich pasm na chromatogramach uzyskanych dla układu rozpuszczalników (1). Niestety, dla kilku gatunków szalwii (np. *S. hians*, *S. verticillata*, *S. pratensis*, *S. azurea*, etc.) nie zaobserwowano pojawienia się niebieskich pasm, lub też intensywność widocznych pasm była stosunkowo niewielka. Z kolei stosując jako odczynnik wywołujący roztwór kwasu siarkowego(VI) uzyskano chromatogramy o znacznie większej ilości rozdzielonych pasm, a co za tym idzie, niosących ze sobą więcej informacji o badanej próbce. Na podstawie uzyskanych rezultatów dla układu rozpuszczalników (1) jako odczynnik wywołujący wybrano roztwór kwasu siarkowego(VI). Tę samą procedurę zastosowano wobec chromatogramów uzyskanych z wykorzystaniem układu rozpuszczalników (2), lecz tutaj dla frakcji zawierającej związki o większej polarności lepszym wyborem okazał się roztwór chlorku glinu. Odczynnik ten, za sprawą obecności polarnych glikozydów i aglikonów flawonoidowych oraz bardziej polarnych kwasów fenolowych, spowodował pojawienie się w świetle UV przy długości fali, $\lambda = 366 \text{ nm}$ kilku plamek.



Rys. 14. Chromatogramy substancji wzorcowych. Faza stacjonarna: SiO_2 . Fazy ruchome: dla (a), (b) i (c) układ rozpuszczalników I, dla (d) układ rozpuszczalników 2. Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: (a), (b) i (c) roztwór kwasu siarkowego(VI); (d) roztwór chlorku glinu. Chromatogramy fotografowano po 30 minutach od momentu ich wywołania. Symbole użytych wzorców przedstawione na rysunku są zgodne z symbolami umieszczonymi w tabeli 20. Roztwory wzorców o stężeniu 0,5mg/ml nakraplano w ilości 5 μl .

Analizując otrzymane chromatogramy zaobserwowano, iż kilka pasm zidentyfikowano we wszystkich badanych gatunkach szalwii i mogą one zostać uznane za markery dla rodzaju *Salvia*. Potwierdzono obecność dwóch kwasów fenolowych, tj. kwasu rozmarynowego i kwasu kawowego, co jest istotne z medycznego punktu widzenia, gdyż obie te substancje wywierają pozytywny wpływ na organizm ludzki, co wynika z licznych badań naukowych. W układzie rozpuszczalników (1) kwas rozmarynowy na chromatogramach pojawia się jako niebieskie pasmo przed derywatyzacją i ciemnofioletowe pasmo po derywatyzacji roztworem kwasu siarkowego(VI), o współczynniku retardacji $R_F = 0,04$. Z kolei w układzie rozpuszczalników (2) zaobserwowano, iż kwas rozmarynowy na chromatogramach jest znacznie lepiej widoczny, co dodatkowo potwierdza jego obecność w badanych ekstraktach. Po zastosowaniu roztworu chlorku glinu kwas ten widoczny jest jako niebieska plamka o współczynniku retardacji $R_F = 0,77$. Natomiast kwas kawowy na chromatogramach uzyskanych przy zastosowaniu układu rozpuszczalników (1) widoczny jest jako niebieskie pasmo o współczynniku retardacji $R_F = 0,11$. Na chromatogramach uzyskanych przy wykorzystaniu układu rozpuszczalników (1) widoczne są również inne, wspólne pasma dla wszystkich analizowanych gatunków szalwii. Jednym z takich pasm jest różowe pasmo kwasu *p*-kumarowego o współczynniku retardacji $R_F = 0,49$, które pojawia się wkrótce po derywatyzacji (Rys. 15). Kwas *p*-kumarowy jest widoczny także w świetle widzialnym jako intensywne fioletowe pasmo, które po upływie pewnego czasu od derywatyzacji staje się brązowe.

Porównując otrzymane chromatogramy zaobserwowano, że dwa gatunki szalwii, tj. *S. sclarea* (2) i *S. canariensis* (8) charakteryzują się stosunkowo niską zawartością kwasu *p*-kumarowego w porównaniu z pozostałymi gatunkami szalwii (Rys. 16 a i b). Innym charakterystycznym pasmem dla wszystkich gatunków, uzyskanym podczas rozdzielu składników w układzie rozpuszczalników (1), jest różowe pasmo o współczynniku retardacji $R_F = 0,26$. Pasma te po pewnym czasie stają się pomarańczowe. Jest ono również charakterystyczne dla gatunku *S. canariensis* (8), który odznacza się najniższą zawartością tego związku. Dla omawianego układu rozpuszczalników na chromatogramach widoczne jest jeszcze jedno pomarańczowe pasmo, wspólne dla wszystkich gatunków szalwii o współczynniku retardacji $R_F = 0,58$. Następnie rozpatrywano chromatogramy uzyskane z zastosowaniem układu eluentów (2), na których, podobnie jak w poprzednim przypadku, zidentyfikowano we wszystkich badanych gatunkach szalwii następujące substancje, charakterystyczne dla rodzaju *Salvia*: kwas rozmarynowy oraz rutynę. Niebieska plamka widoczna po zastosowaniu roztworu chlorku glinu jako odczynnika wywołującego o współczynniku retardacji $R_F = 0,77$ pochodzi od kwasu rozmarynowego, a żółta plamka o współczynniku retardacji $R_F = 0,61$ pochodzi od rutyny. Kolejną substancją, jaką zidentyfikowano jednak jedynie w zaledwie kilku gatunkach szalwii, takich jak *S. pratensis ssp. Haematodes*, *S. amplexicaulis* i *S. nemorosa*, jest kwas chlorogenowy. To właśnie rutynę oraz kwas chlorogenowy zidentyfikowano dopiero podczas zastosowania układu rozpuszczalników (2), ponieważ w pierwszym układzie oba te związki pozostawały na linii startu.



Rys. 15. Chromatogramy dwudziestu badanych gatunków szalwii (*Salvia sp.*). Faza stacjonarna: SiO₂. Faza ruchoma: układ rozpuszczalników (1). Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: 10% metanolowy roztwór kwasu siarkowego(VI). Chromatogramy fotografowano wkrótce po zakończonej derywatacji. Zdjęcie wykonano w świetle: widzialnym (a) i (c); w świetle UV przy długości fali, $\lambda = 366$ nm (b) i (d). Numery umieszczone pod zdjęciami odpowiadają gatunkom szalwii w tabeli 19. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.

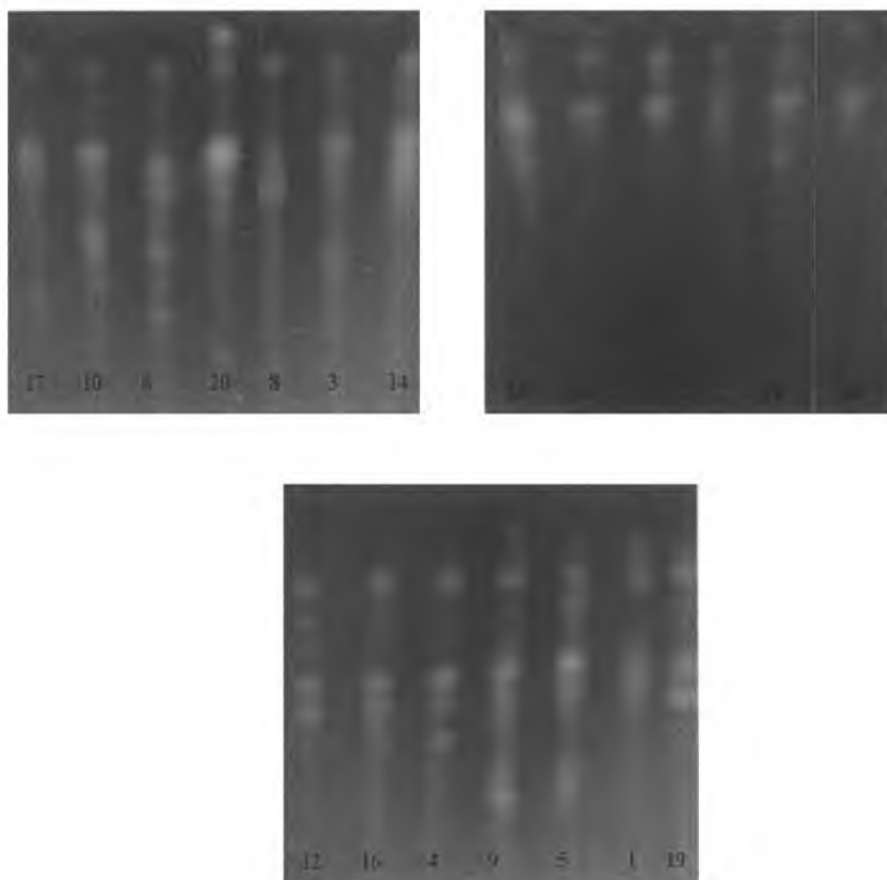
Podczas analizy chromatogramów, zarówno ich cyfrowe profile skanowania (densytogramy), jak i te uzyskane przy użyciu programu Image J zostały wykorzystane równolegle z tradycyjnymi sposobami prezentacji fingerprintów (Rys. 18a-c). Zastosowany podczas przedstawionej tu analizy binarny układ rozwijania chromatogramów wykorzystano do porównania składników zawartych w ekstraktach dwudziestu gatunków szalwii, a także do odnalezienia podobieństw i różnic w składzie chemicznym badanego materiału roślinnego. Densytogramy umożliwiły wykrycie składników, które trudno było zauważyć na chromatogramach, jak również posłużyły do oceny ilościowej rozdzielonych substancji. To rozwiązanie okazało się szczególnie użyteczne podczas analizy chromatogramów uzyskanych przy zastosowaniu układu rozpuszczalników (2) i derywatywacji roztworem chlorku glinu, gdyż plamki niewyraźne na chromatogramach stawały się znacznie lepiej widoczne na densytogramach. Funkcja „kalkulator obrazu” programu Image J umożliwia porównanie wszystkich chromatogramów oraz pozwala zauważyć nawet drobne różnice między nimi, które inaczej mogłyby zostać niezauważone. Densytogramy frakcji semi-polarnej zarejestrowane przy dwóch długościach fali świetlnej ($\lambda = 254 \text{ nm}$ i $\lambda = 366 \text{ nm}$) przedstawiono w tabeli 21.

Szałwia lekarska jest jedynym farmakopealnym gatunkiem w prezentowanych badaniach, obecnym w polskiej medycynie. Z tego względu analiza innych gatunków szalwii jest ważna, ponieważ uzyskane fingerprinty mogą być przydatne w ocenie podobieństw profili chemicznych tych właśnie gatunków do profilu szalwii lekarskiej i tym samym analiza ta może przyczynić się do wskazania dalszych dobrych kandydatów na leki ziołowe z rodzaju *Salvia*.

Porównanie chromatogramów uzyskanych podczas użycia obu układów rozpuszczalników wykazuje, iż profil chemiczny gatunku *S. triloba* (17) jest najbardziej zbliżony do profilu chemicznego *S. officinalis* (13). Oba gatunki charakteryzują się obecnością w mniej polarnej frakcji substancji widocznych na chromatogramie jako ciemne pasma, z których dwa znajdują się tuż pod pomarańczowym pasmem kwasu *p*-kumarowego, o współczynnikach retardacji odpowiednio $R_F = 0,38$ i $R_F = 0,44$ oraz jedno nad pasmem o współczynniku retardacji $R_F = 0,57$. Obecność tych ciemnych pasm zaobserwowano także dla gatunku *S. canariensis* (8), charakteryzującego się niską zawartością kwasu *p*-kumarowego. Mimo wyraźnych podobieństw gatunków *S. triloba* i *S. officinalis*, po dokładnym przyjrzeniu się uzyskanym fingerprintom łatwo zauważyć różnicę między nimi. Umożliwiają to szczególnie chromatogramy bardziej polarnej frakcji, na których wyraźnie widać dodatkowe żółte pasmo w niższym zakresie współczynnika retardacji (R_F) dla gatunku *S. triloba*. Pozostałe gatunki wykazują na tyle charakterystyczne chromatogramy, iż łatwo je odróżnić od *S. officinalis*.

W celu lepszego opisu profili chemicznych wszystkie uzyskane chromatogramy (przy zastosowaniu układu rozpuszczalników (1)) podzielono na trzy części, wykorzystując w tym celu dwa markery o współczynnikach retardacji odpowiednio $R_F = 0,26$ i $R_F = 0,49$ jako granic trzech stref. Porównano ilość, pozycję, kolor oraz intensywność wszystkich pasm występujących w każdej z trzech części chromatogramu dla wszystkich badanych gatunków szalwii. W analizie porównawczej wykorzystano również densytogramy oraz obrazy przetworzone przy użyciu programu Image J. Porównując pierwszy fragment chromatogramu położony między linią startu a markerem o wartości $R_F = 0,26$ stwierdzono, że uzyskane profile chromatograficzne tego fragmentu są niemal identyczne dla wszystkich badanych gatunków szalwii. Pozostałe dwa fragmenty chromatogramów są bardziej charakterystyczne dla poszczególnych gatunków szalwii i mogą zostać wykorzystane do ich rozróżnienia.

Fingerprinty otrzymane w układzie rozpuszczalników 1 wykazały podobieństwo dla następujących gatunków szalwii: *S. tesquicola*, *S. amplexicaulis*, *S. cadmica*, *S. nemorosa*, *S. jurisicii*, *S. stepposa*, *S. glutinosa* i *S. atropatana*. Podobieństwo chromatogramów można również zaobserwować dla tych gatunków w przypadku bardziej polarnej frakcji (układ rozpuszczalników (2)). Wszystkie wyżej wymienione gatunki szalwii charakteryzują się obecnością pasm (układ rozpuszczalników (2), światło UV, $\lambda = 366$ nm) w zakresie niższych wartości współczynnika retardacji (R_F), w odróżnieniu od pozostałych gatunków szalwii. Omawianą grupę gatunków szalwii na podstawie uzyskanych fingerprintów można z kolei podzielić na mniejsze podgrupy. Gatunki *S. tesquicola*, *S. amplexicaulis* i *S. cadmica* można z łatwością odróżnić od pozostałych gatunków szalwii, ze względu na obecność niebieskiego pasma herniaryny o $R_F = 0,55$. Niemniej jednak dla gatunku *S. cadmica* nie zaobserwowano pasma o $R_F = 0,45$, które jest wyraźnie widoczne na chromatogramach pozostałych dwóch gatunków (Rys. 15). Na chromatogramach pozostałych gatunków szalwii, mimo, iż są one do siebie podobne, również można dostrzec różnice. Na przykład profil chromatograficzny *S. jurisicii* cechuje się obecnością jasnopomarańczowego pasma o $R_F = 0,32$, którego nie zaobserwowano na chromatogramach pozostałych gatunków szalwii.



Rys. 17. Porównanie chromatogramów dwudziestu badanych gatunków szalwii (*Salvia* sp.). Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: układ rozpuszczalników (2). Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Zdjęcie wykonano wkrótce po zakończonej derywatyzacji. Rejestracja zdjęć w świetle UV przy długości fali, $\lambda = 366$ nm. Numery umieszczone pod zdjęciami odpowiadają gatunkom szalwii w tabeli 19. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .

Na podstawie analizowanych fingerprintów gatunki *S. officinalis*, *S. triloba* i *S. canariensis* można uznać za odrębną podgrupę gatunków, charakteryzującą się podobnymi profilami chromatograficznymi. Kolor, kolejność oraz intensywność charakterystycznych pasm dla tych gatunków szaławii zostały już opisane w tym rozdziale. Do trzeciej podgrupy można zaliczyć następujące gatunki szaławii: *S. sclarea*, *S. staminea*, *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. hians*, *S. forkaohlei*, *S. azurea*, *S. verticillata* oraz *S. deserta*. Dla wymienionych gatunków wszystkie trzy części na jakie podzielono chromatogramy (układ rozpuszczalników (1)) zawierają mniej pasm, niż w przypadku reszty badanych gatunków. Takie same wnioski względem omawianych gatunków szaławii wyciągnięto na podstawie chromatogramów uzyskanych przy zastosowaniu układu rozpuszczalników (2). Niemniej jednak w porównaniu z dwoma pozostałymi podgrupami ta jest znacznie bardziej zróżnicowana.

W tym miejscu należy podkreślić, że fingerprinty uzyskane dla *S. lavandulifolia* są zupełnie inne, niż dla pozostałych gatunków szaławii, tak więc nie można jej przypisać do żadnej z poprzednio omówionych podgrup.

Porównując zawartość związków fenolowych na podstawie chromatogramów uzyskanych przy zastosowaniu układu rozpuszczalników 1 stwierdzono, że *S. officinalis* charakteryzuje się największą sumaryczną powierzchnią rozdzielonych pików (Rys. 19b). Innymi gatunkami o znaczącej sumarycznej powierzchni pików są: *S. lavandulifolia*, *S. triloba*, *S. nemorosa*, *S. jurisicii*, *S. azurea* oraz *S. atropatana*. Natomiast gatunkami o najmniejszej sumarycznej powierzchni pików okazały się *S. sclarea*, *S. deserta* i *S. staminea*. Z kolei gatunkami o największej zawartości kwasu kawowego są: *S. officinalis*, *S. nemorosa*, *S. lavandulifolia*, *S. triloba*, *S. azurea* i *S. jurisicii*, podczas gdy gatunki *S. lavandulifolia*, *S. jurisicii*, *S. azurea*, *S. hians*, *S. pratensis* ssp. *Haematodes* oraz *S. nemorosa* wykazały największą zawartość kwasu *p*-kumarowego (Rys. 19a).

Na podstawie danych zawartych na rysunkach 15 i 17 uznano, że proponowana metoda analizy stanowi trafny wybór dla badanych gatunków szaławii. Wszystkie te gatunki utworzyły charakterystyczne fingerprinty, na podstawie, których mogą z łatwością zostać rozróżnione między sobą. Na podstawie powtarzalności i średniej precyzji wykazano, iż powierzchnie pików oraz ich kolejność na poszczególnych chromatogramach są identyczne. Zmienność wartości współczynników retardacji (R_F) testowana na kilku losowo wybranych pasmach nie przekraczała w przypadku powtarzalności wartości 0,02 oraz w przypadku precyzji wartości 0,04. Obliczenia wykonano na podstawie wytycznych cGMP [24]. Na podstawie uzyskanych profili HPTLC stwierdzono, że wszystkie obecne na chromatogramach piki mogą zostać uznane za takie, które charakteryzują poszczególne gatunki szaławii. Dalsze wykorzystanie uzyskanych profili chromatograficznych w celu porównania różnych gatunków szaławii jest w pełni uzasadnione.

W celu sprawdzenia stabilności próbki podczas procesu chromatografowania przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem chromatografii dwukierunkowej. Po dwukierunkowym rozwinięciu chromatogramów zarówno w układzie rozpuszczalników (1), jak i w układzie rozpuszczalników (2) plamki leżały na przekątnej płytek, co wskazywało na brak powstawania artefaktów. Próbkę okazały się również stabilne w roztworze.

Fingerprinty poddawano derywatyżacji, używając w tym celu jako odczynnika wywołującego roztworu kwasu siarkowego(VI), wobec czego stabilność rezultatów tego procesu również została sprawdzona. Zdjęcia chromatogramów wykonane po upływie 5 i 10 minut od zakończenia derywatyżacji nie różniły się od tych wykonanych bezpośrednio po derywatyżacji. Jednak po upływie 30 minut kilka pasm

zmieniło kolor z różowego na pomarańczowy, a w innych przypadkach (np. dla kwasu kawowego) pasma stały się znacznie bardziej widoczne (Rys. 16). Po upływie 24 godzin nie zaobserwowano żadnych, dalszych zmian na otrzymanych fingerprintach, a wszystkie rozdzielone pasma były wyraźnie widoczne bez kolejnych zmian w ich zabarwieniu. Zatem, porównując zdjęcia chromatogramów tuż po zakończonej derywatywacji, a następnie po upływie pewnego czasu od jej zakończenia możemy przyjąć, iż w obu przypadkach uzyskane wyniki są wiarygodne.

Podczas opracowywania metody rozdziału sprawdzano wpływ kilku parametrów takich, jak skład fazy ruchomej, temperatura ogrzewania oraz czas suszenia na otrzymywane rezultaty. Wszystkie odnotowane zmiany wywierały znikomy wpływ na jakość otrzymywanych chromatogramów, z wyjątkiem temperatury ogrzewania. Gdy temperatura ta była niższa niż 100°C, to rozdzielone pasma były słabiej widoczne, a w niektórych przypadkach były całkowicie niewidoczne. Tak więc ważne jest to, aby podczas przeprowadzania rozdziału chromatograficznego według opisanej procedury utrzymać stałą temperaturę ogrzewania, wynoszącą 105°C \pm 2 °C. Podczas zmian składu faz ruchomych odnotowano jedynie niewielką zmianę wartości współczynników retardacji (R_F) równą \pm 0,02, nie zaobserwowano natomiast żadnych wyraźnych różnic w kształcie profili chromatograficznych.

Przeprowadzona walidacja metody polegała na sprawdzeniu specyficzności, precyzji (odtwarzalności i średniej precyzji), stabilności i odporności. Dokładny opis przeprowadzonych testów opisano w części metodycznej, dotyczącej przedstawionego w tym rozdziale eksperymentu.

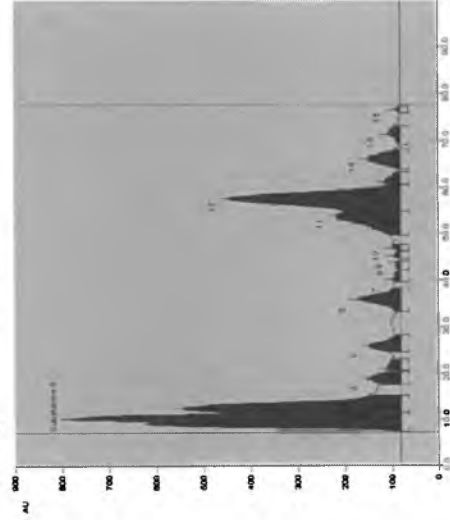
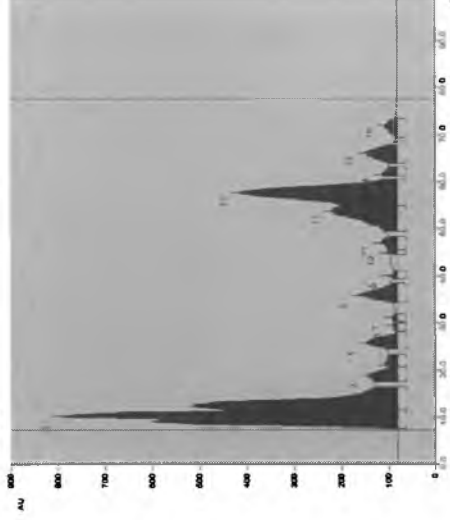
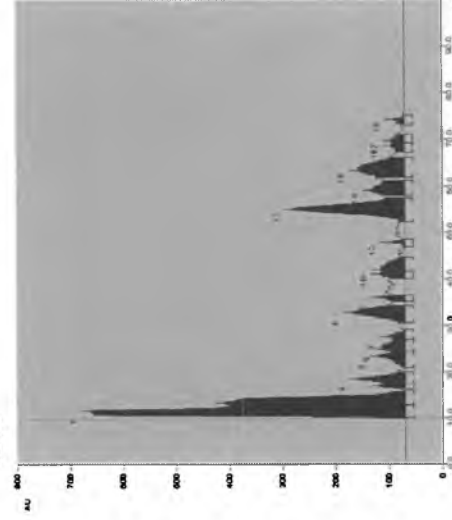
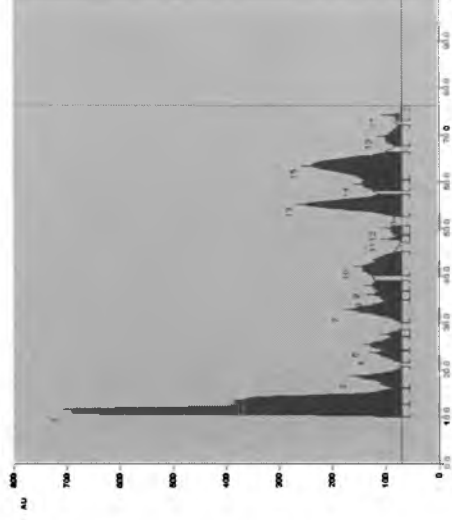
Wiadomo jest, iż rozdzielczość oraz odtwarzalność są definitywnie znacznie gorsze w przypadku techniki HPTLC gorsze, niż dla techniki HPLC. Jednakże na podstawie uzyskanych w tym eksperymencie wyników udowodniono, że wybór chromatografii cienkowarstwowej do konstrukcji charakterystycznych fingerprintów dla kilku, a nawet kilkunastu próbek jednocześnie okazał się trafnym wyborem. Zaletami wykorzystanej techniki jest stosunkowo krótki czas analizy i niskie koszty związane z zakupem płytek. Wydaje się jednak, że największą zaletą zastosowanej metody jest możliwość prezentacji otrzymanych wyników w postaci wielobarwnych obrazów.

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty stanowią kolejny krok zmierzający w kierunku konstrukcji charakterystycznych fingerprintów złożonych mieszanin, jakimi są ekstrakty roślinne z wykorzystaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej. Konstrukcja binarnych fingerprintów umożliwiła analizę ekstraktów w szerokim spektrum polarności. Z kolei wykorzystanie densytogramów oraz obrazów przetworzonych przy użyciu programu Image J sprawiło, iż analiza porównawcza stała się znacznie prostsza do przeprowadzenia. Ponadto, jak wykazano w niniejszym rozdziale, zaproponowana metoda okazała się przydatna przy określaniu zarówno podobieństw, jak i różnic w badanych gatunkach szalwii, zatem z powodzeniem może zostać wykorzystana w badaniach chemotaksonomicznych, obejmujących określanie wzajemnych relacji w obrębie rodzaju *Salvia*. Przedstawiona metoda konstrukcji binarnych fingerprintów jest szybka i prosta do przeprowadzenia. Oprócz tego przeprowadzona walidacja metody jednoznacznie wskazuje na niezawodność opracowanej procedury chromatograficznej.

Tab. 21. Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szalwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254 \text{ nm}$ i $\lambda = 366 \text{ nm}$

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254 \text{ nm}$	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$
<i>S. amplexicaulis</i>		
<i>S. atropatana</i>		

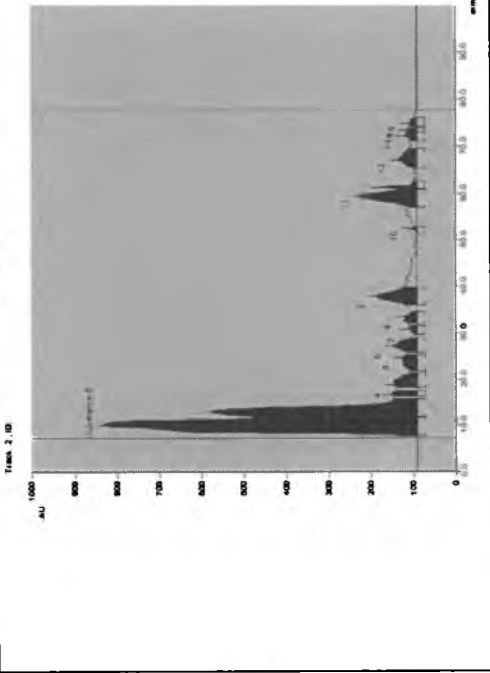
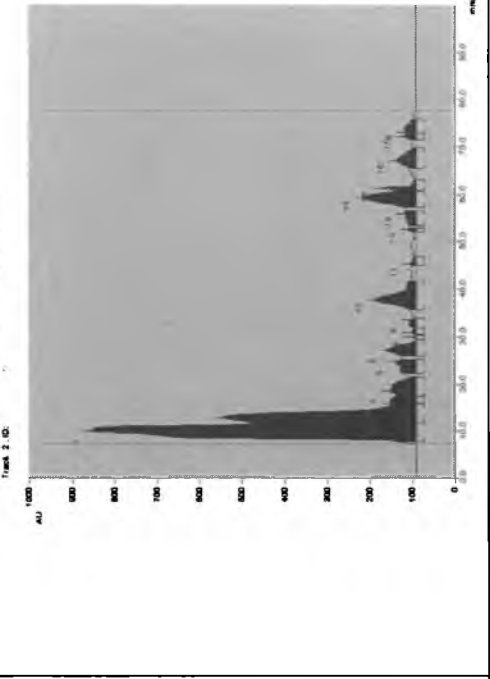
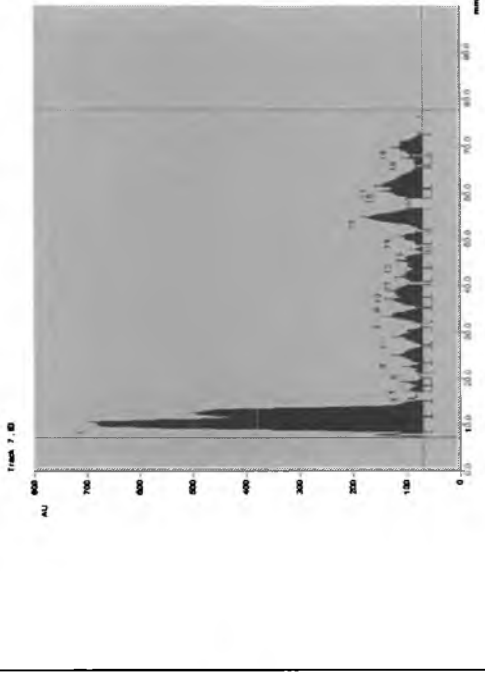
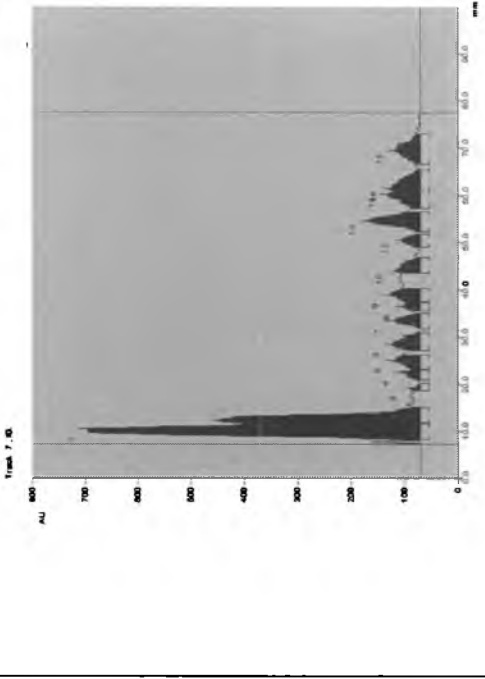
Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szachwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. azurea</i>		
<i>S. cadmica</i>		

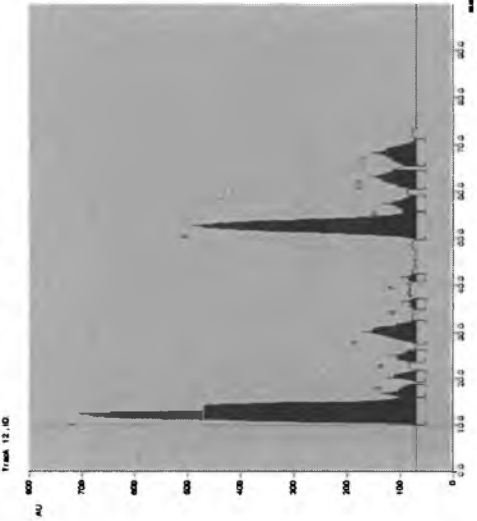
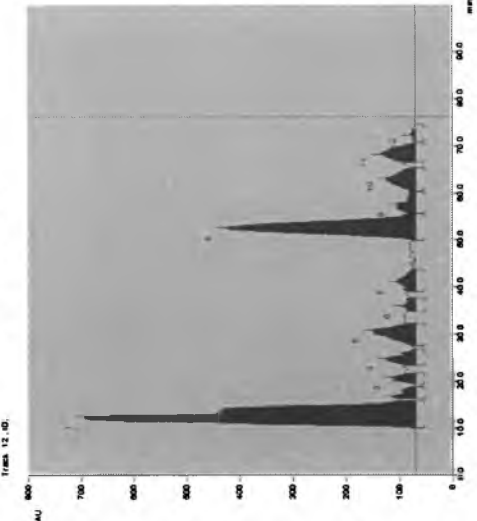
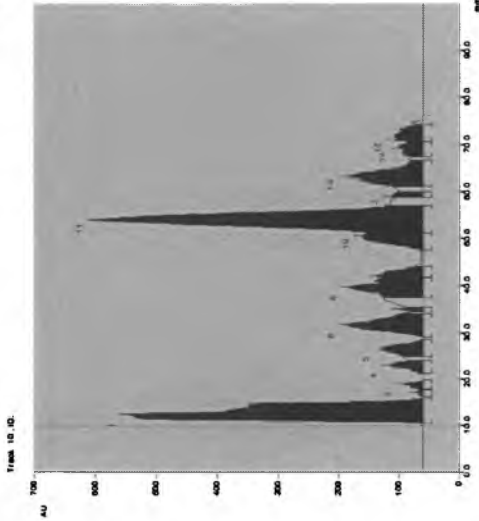
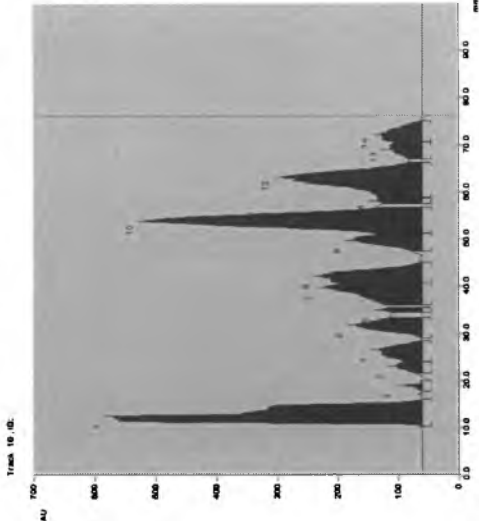
Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szalwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. canariensis</i>		
<i>S. deserta</i>		

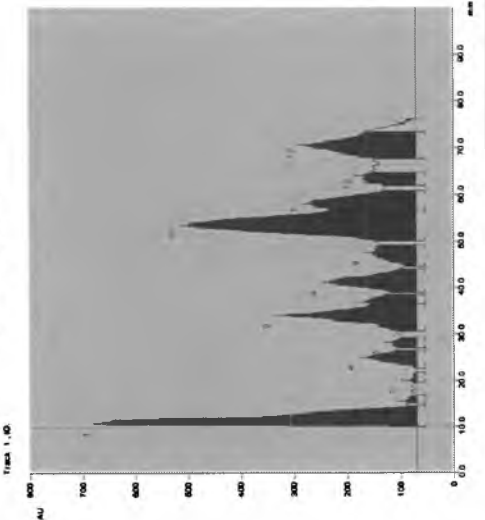
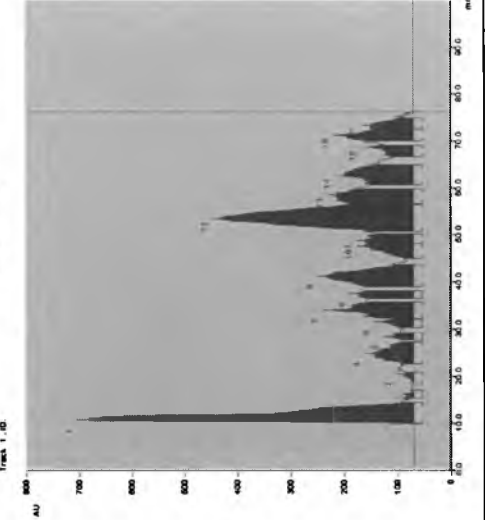
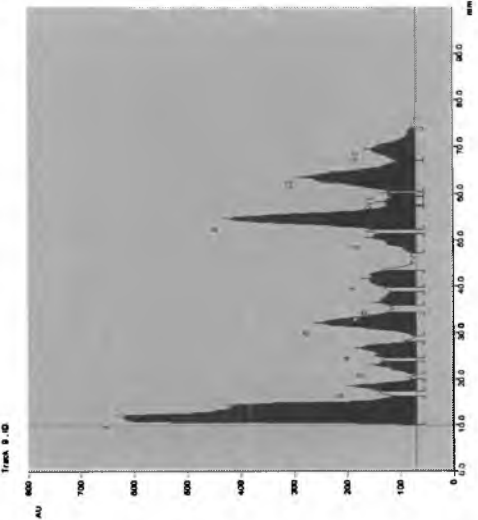
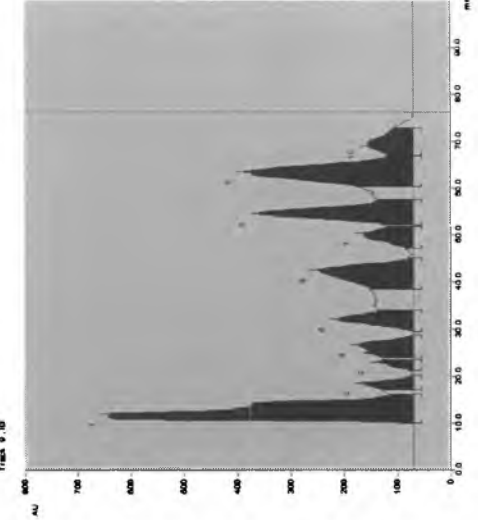
Tab. 21. (c.d.) Densytoprogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szachwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

Gatunek	Densytoprogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytoprogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. forskahlei</i>	 <p>Track 2, 10</p> <p>The graph shows a large peak at approximately 254 nm and several smaller peaks at higher wavelengths (300-400 nm). The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0 to 1000. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 250 to 400.</p>	 <p>Track 2, 10</p> <p>The graph shows a large peak at approximately 366 nm and several smaller peaks at higher wavelengths (400-500 nm). The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0 to 1000. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 350 to 500.</p>
<i>S. glutinosa</i>	 <p>Track 7, 10</p> <p>The graph shows a large peak at approximately 254 nm and several smaller peaks at higher wavelengths (300-400 nm). The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0 to 800. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 250 to 400.</p>	 <p>Track 7, 10</p> <p>The graph shows a large peak at approximately 366 nm and several smaller peaks at higher wavelengths (400-500 nm). The y-axis is labeled 'AU' and ranges from 0 to 800. The x-axis is labeled 'nm' and ranges from 350 to 500.</p>

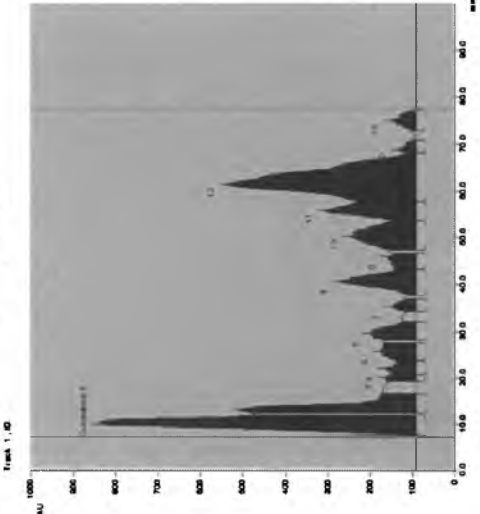
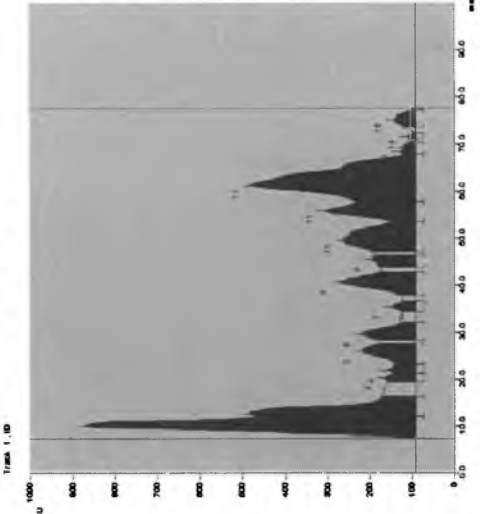
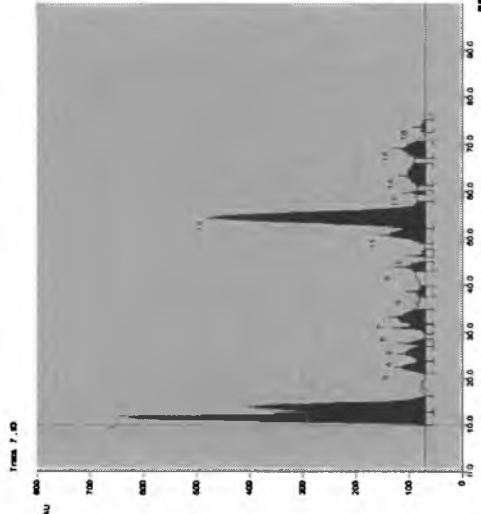
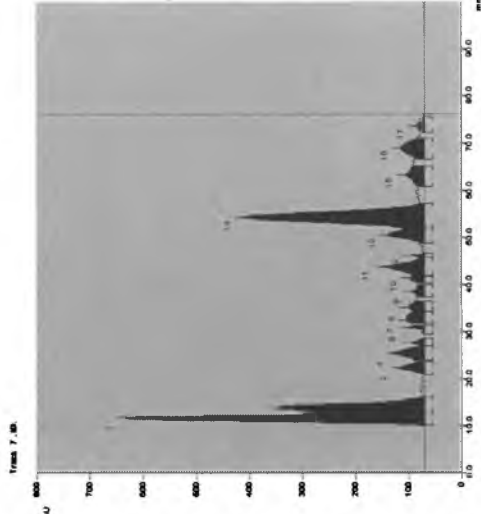
Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szalwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. hians</i>		
<i>S. jurisicii</i>		

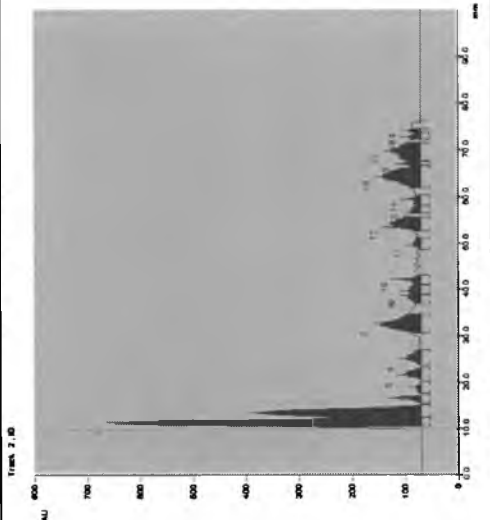
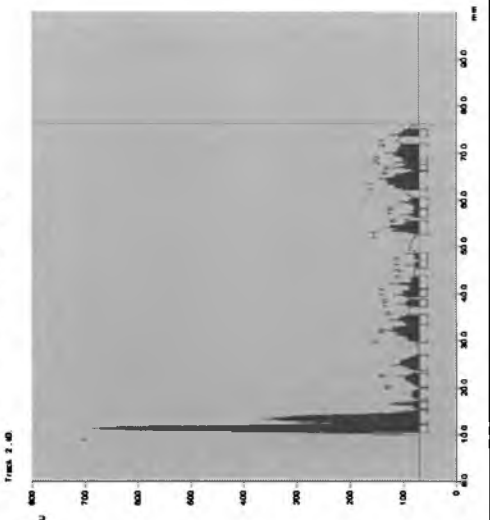
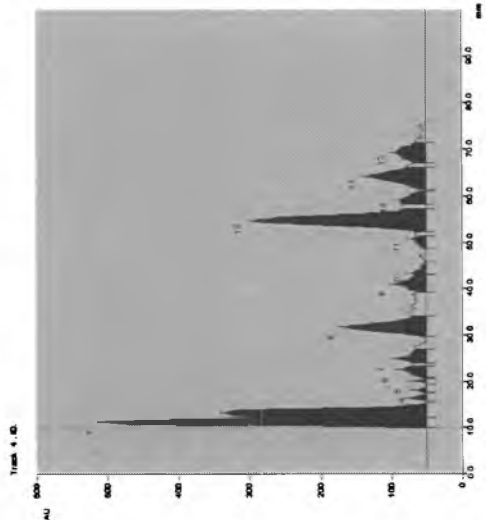
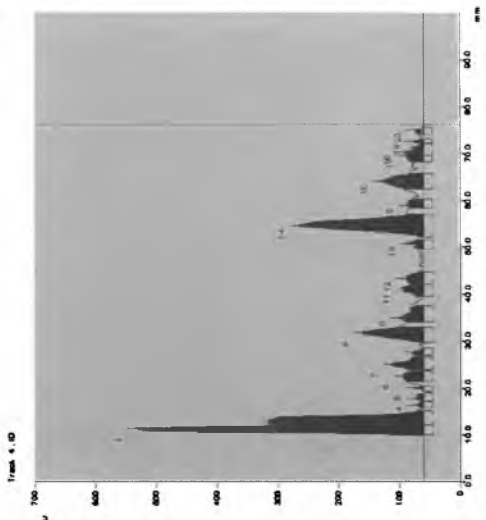
Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szalwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. lavandulifolia</i>		
<i>S. nemorosa</i>		

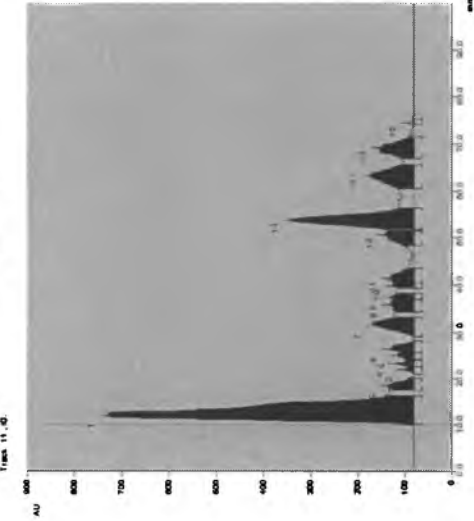
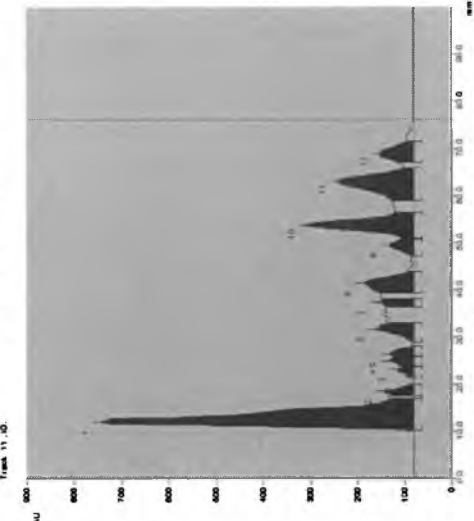
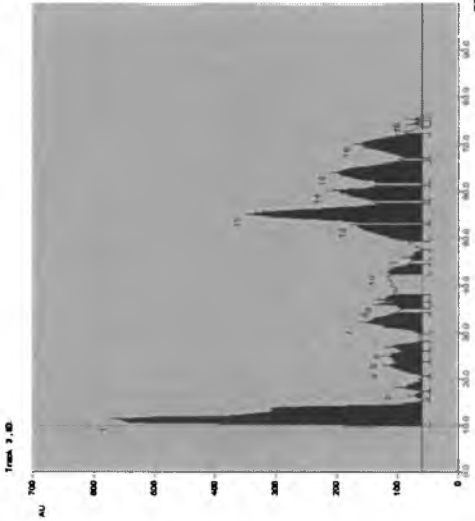
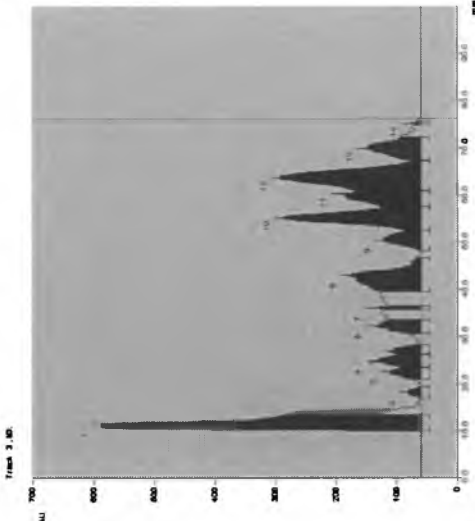
Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polarnej dwudziestu gatunków szatwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. officinalis</i>		
<i>S. pratensis</i>		

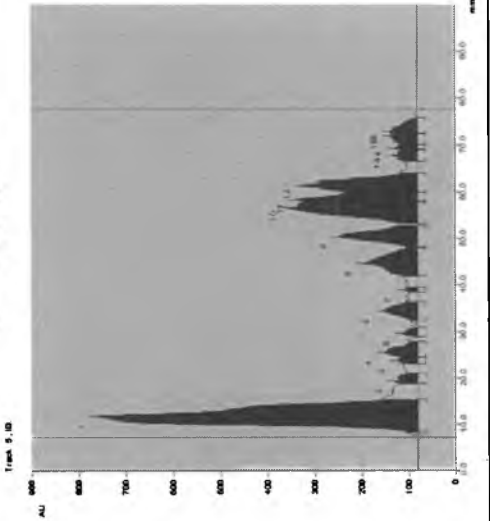
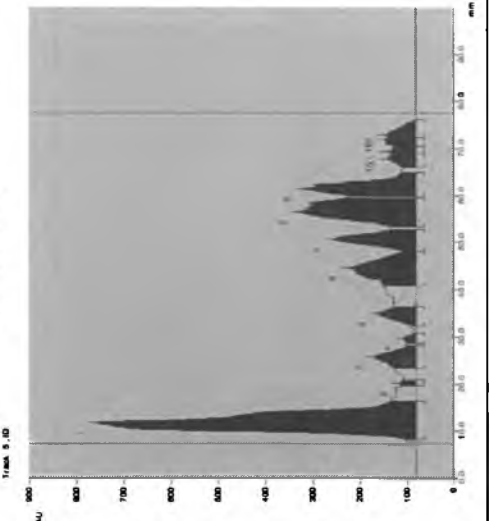
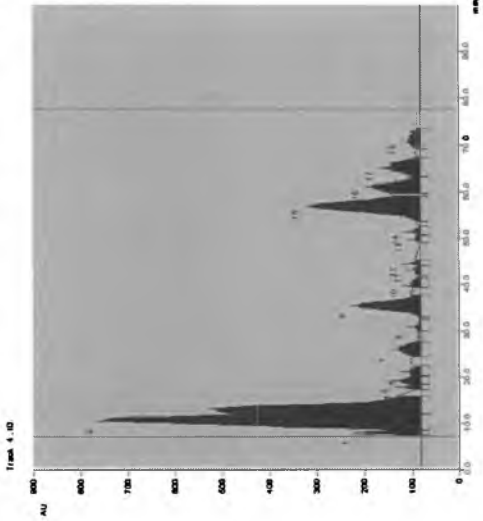
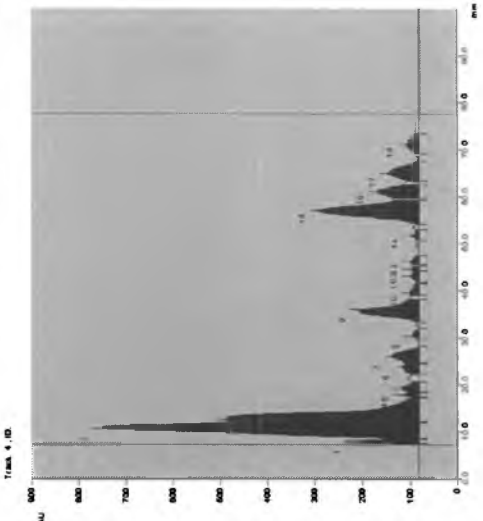
Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szalwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

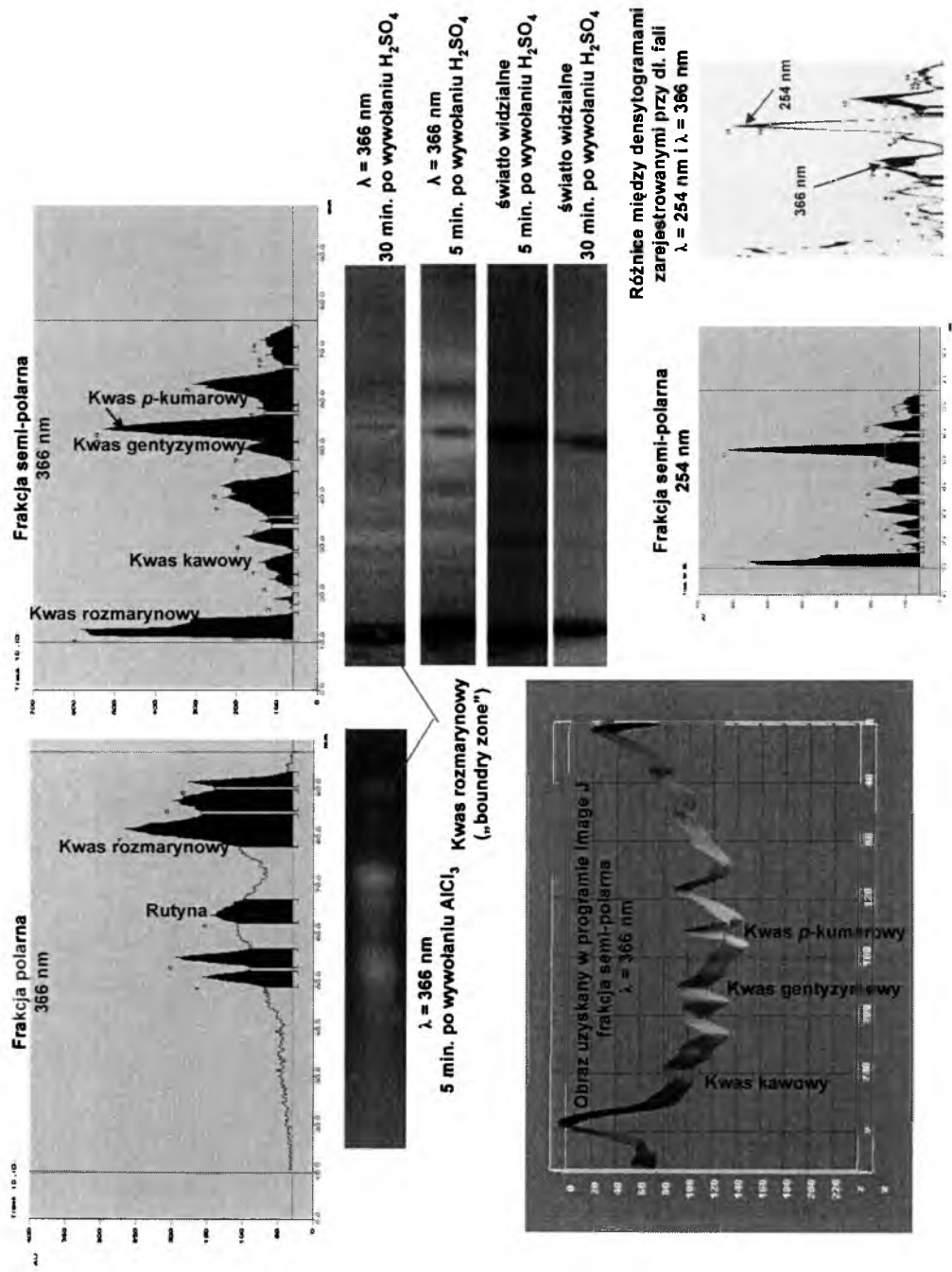
Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. sclarea</i>		
<i>S. staminea</i>		

Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szalwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm

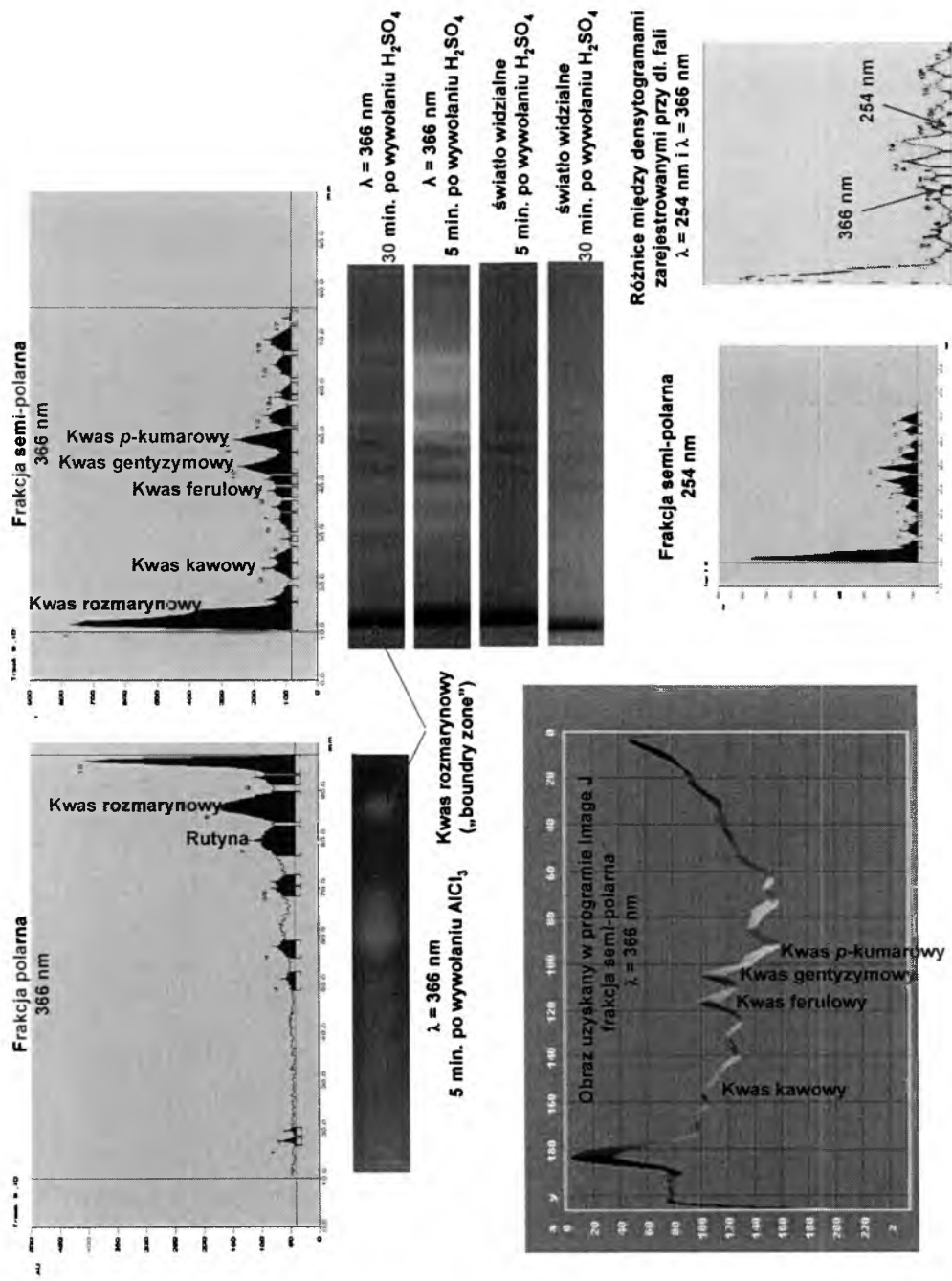
Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm
<i>S. stepposa</i>		
<i>S. tesquicola</i>		

Tab. 21. (c.d.) Densytogramy frakcji semi-polamej dwudziestu gatunków szachwii zarejestrowane przy długości fali świetlnej $\lambda = 254 \text{ nm}$ i $\lambda = 366 \text{ nm}$

Gatunek	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 254 \text{ nm}$	Densytogram zarejestrowany przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$
<i>S. triloba</i>		
<i>S. verticillata</i>		

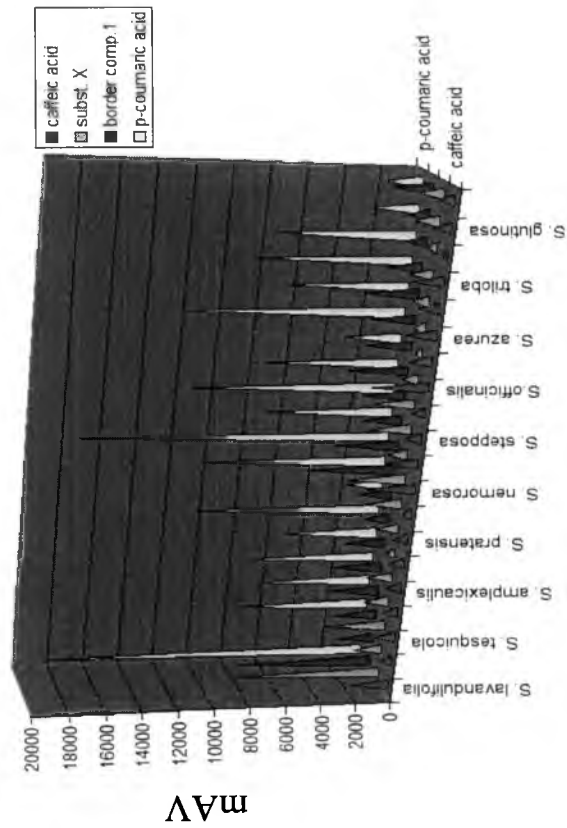


Rys. 18. Przykład konstrukcji złożonych fingerprintów z wykorzystaniem zdjęć chromatogramów oraz przetworzonych obrazów frakcji mniej i bardziej polamej dla wybranych gatunków szatwii: (a) *S. jurisicii*.

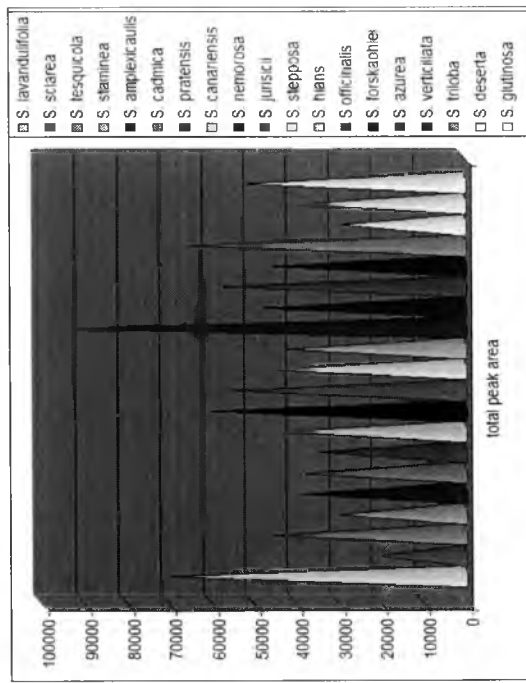


Rys. 18. (c.d.) Przykład konstrukcji złożonych fingerprintów z wykorzystaniem zdjęć chromatogramów oraz przetworzonych obrazów frakcji mniej i bardziej polamej dla wybranych gatunków szatwii: (b) *S. canariensis*.

a)



b)



Rys. 19. (a) Ilościowe porównanie zawartości wybranych związków fenolowych w analizowanych gatunkach szatwii. (b) Porównanie całkowitej powierzchni pików dla badanych gatunków szatwii. Kolejność gatunków zachowano, jak w tabeli 19. Substancja X to nieznana substancja o $R_f = 0,58$ dla układu rozpuszczalników (1) obecna we wszystkich badanych gatunkach.

W kolejnym etapie badań podjęto także próby zastosowania specjalnych technik rozwijania chromatogramów takich, jak gradientowe wielokrotne rozwijanie (GMD – ang. *Gradient Multiple Development*), wielokrotna elucja gradientowa (MGD – ang. *Multiple Gradient Development*) oraz dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa (2D–TLC).

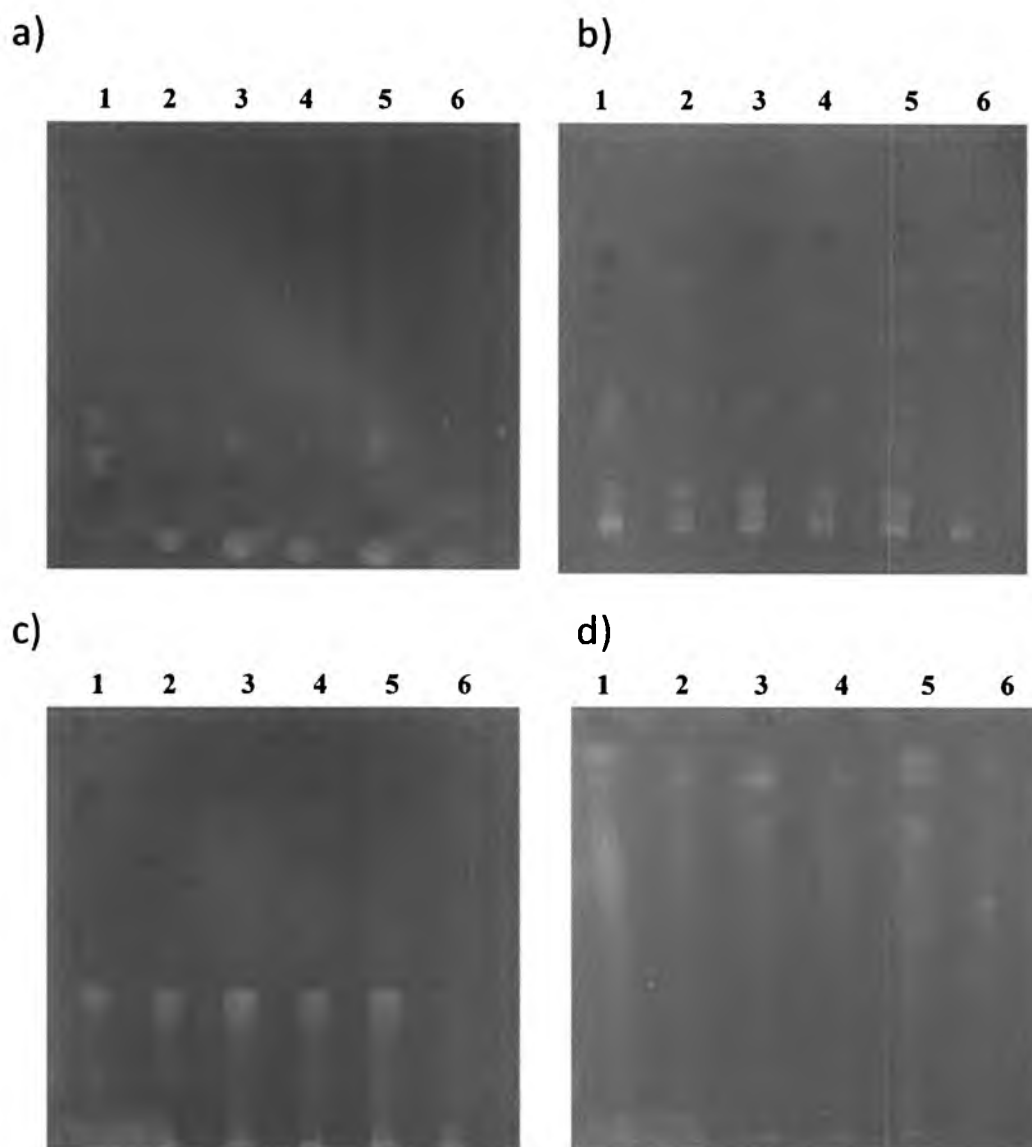
3.2.2. Analiza metanolowych ekstraktów szalwii techniką gradientowego wielokrotnego rozwijania (GMD - *Gradient Multiple Development*)

Stosując technikę GMD chromatogramy rozwijano na stałą wysokość 9 cm z wykorzystaniem zestawu faz ruchomych o rosnącej sile elucyjnej. Między poszczególnymi rozwinięciami płytki pokryte żelem krzemionkowym dokładnie suszono. Na rysunku 20 przedstawiono kolejne etapy rozwijania z zastosowaniem techniki GMD. Dobierając układy chromatograficzne sprawdzano różne dwuskładnikowe mieszaniny rozpuszczalników. W mieszaninach tych jako składnik polarny zastosowano kolejno acetonitryl, metanol, dioksan oraz izopropanol. Najlepsze rezultaty rozdziału uzyskano, stosując mieszaninę izopropanolu z n-heptanem o różnym składzie ilościowym.

Analizie poddano sześć gatunków szalwii: *S. officinalis* (1), *S. sclarea* (2), *S. azurea* (3), *S. pratensis* (4), *S. stepposa* (5) oraz *S. deserta* (6). Podczas pierwszego etapu rozwijania użyto eluentu o najmniejszej sile elucyjnej, tj. mieszaninę izopropanolu i n-heptanu w stosunku objętościowym 5 : 95, co umożliwiło porównanie składu frakcji związków o najniższej polarności. Na rysunku 20a widoczne są jasnoniebieskie pasma, o najwyższych wartościach współczynnika retardacji (R_F). Związki nisko polarne przy użyciu bardziej polarnych faz ruchomych byłyby bowiem spychane na linię czoła fazy ruchomej i maskowane przez chlorofil. Po pierwszym etapie rozwijania na chromatogramie zauważono pierwsze różnice między poszczególnymi gatunkami szalwii. Dla *S. officinalis* zaobserwowano trzy charakterystyczne jasne pasma, dla *S. pratensis* oraz *S. azurea* jedno pasmo, natomiast dla *S. deserta* zaobserwowano ich brak. Po drugim rozwinięciu zauważono kolejne różnice (Rys. 20b). Dla *S. officinalis* zaobserwowano żółte pasmo o R_F równym około 0,30, czego nie widać dla pozostałych gatunków. W pozostałych dwóch etapach tę samą płytkę rozwijano eluentami o wciąż rosnącej sile elucyjnej (Rys. 20 c, d). Po każdym rozwinięciu płytkę suszono, skanowano i porównywano poszczególne gatunki, biorąc pod uwagę ilość, kolor, intensywność oraz sekwencję poszczególnych plamek.

Zastosowanie techniki GMD umożliwia analizę złożonych ekstraktów zawierających związki o różnej polarności poprzez możliwość dobierania odpowiedniej ilości rozwinięć. W technice tej można także dowolnie modyfikować skład faz ruchomych, jak również zmieniać dystans rozwijania w celu polepszenia rozdziału chromatograficznego. Technika ta jednak nie jest pozbawiona wad. Podczas kilkukrotnego rozwijania istnieje możliwość tworzenia się artefaktów, głównie związanych z chemisorpcją i/lub rozkładem związków pod wpływem eluentów. Celem zapobieżenia takim zjawiskom, przy pomocy techniki dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej sprawdzono, czy część powstałych plamek nie stanowi artefaktów. W tym celu płytki rozwijano w dwóch prostopadłych do siebie kierunkach, stosując te same składniki fazy ruchomej. Po dwukierunkowym rozwinięciu plamki leżały na przekątnej płytek, co wskazywało na brak powstawania artefaktów. Technika GMD, choć jest szczególnie użyteczna w analizie złożonych próbek, to jednak znacznie wydłuża czas analizy poprzez konieczność kilkukrotnego rozwijania i skanowania płytek, co jest niewątpliwie okolicznością niekorzystną. Dużo łatwiej porównywać

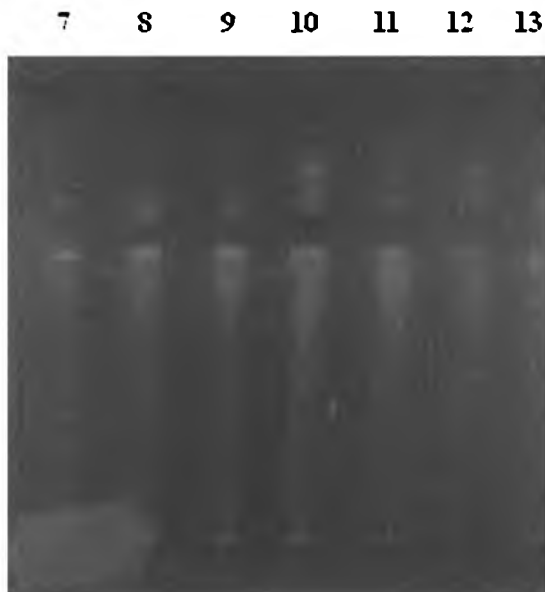
pojedyncze fingerprinty i dlatego postanowiono zastosować technikę MGD, która pozwala porównywać otrzymane odciski palca na jednym chromatogramie.



Rys. 20. Kolejne etapy rozwijania z zastosowaniem techniki GMD dla sześciu wybranych gatunków szalwii. Faza stacjonarna: SiO_2 . Odległość rozwijania: 9 cm. Zastosowane w gradiencie eluenty: (a) izopropanol : n-heptan, 5 : 95 (v/v); (b) izopropanol : n-heptan, 10 : 90 (v/v); (c) izopropanol : n-heptan, 40 : 60 (v/v); (d) izopropanol : n-heptan, 80 : 20 (v/v). Zdjęcia chromatogramów wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Numery odpowiadają następującym gatunkom: *S. officinalis* (1), *S. sclarea* (2), *S. azurea* (3), *S. pratensis* (4), *S. stepposa* (5) oraz *S. deserti* (6). Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .

3.2.3. Analiza metanolowych ekstraktów szalwii techniką wielokrotnej elucji gradientowej (MGD - ang. *Multiple Gradient Development*)

Kolejną specjalną techniką rozwijania, którą zastosowano w niniejszych badaniach jest technika MGD. W pierwszym kroku tej analizy płytki były rozwijane na całej długości eluentem o najmniejszej sile elucyjnej. W każdym kolejnym etapie dystans rozwijania był skracany, jednocześnie stosując fazy ruchome o wzrastającej sile elucyjnej. Po każdym kolejnym etapie odległość, na jaką rozwijano płytki była określana na podstawie położenia już rozdzielonych plamek. Odległość tę dobierano w taki sposób, aby substancje rozdzielone we wcześniejszych etapach pozostały takimi w kolejnych krokach analizy (Rys. 21).



Rys. 21. Przykład zastosowania techniki MGD dla siedmiu wybranych gatunków szalwii: *S. hians* (7), *S. verticillata* (8), *S. staminea* (9), *S. nemorosa* (10), *S. amplexicaulis* (11), *S. lavandulifolia* (12) oraz *S. glutinosa* (13). Faza stacjonarna: SiO₂. Odległość rozwijania: 9 cm. Płytki z naniesionymi ekstraktami szalwii była rozwijana trójetapowo, przy użyciu następujących eluentów: I etap – izopropanol : n-heptan, 40 : 60 (v/v); II etap – izopropanol : n-heptan, 60 : 40 (v/v) III etap – metanol : kwas octowy : woda, 78:2:20 (v/v). Zdjęcie chromatogramów wykonano w świetle UV przy długości fali $\lambda = 366$ nm. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.

Technika MGD pozwala na analizę próbek o skomplikowanym składzie chemicznym, w których składniki różnią się znacznie polarnością. Niemniej jednak rodzi również pewne problemy związane z rozdziałem chromatograficznym. Jednym z głównych problemów jest ilość możliwych do rozdzielania substancji, ponieważ wszystkie one powinny się znaleźć między miejscem aplikacji a czołem fazy ruchomej ostatniego rozwinięcia. Jest to znaczne ograniczenie tej techniki w przypadku analizy bardzo złożonych próbek. Ponadto zastosowany układ chromatograficzny nie pozwala na znalezienie wyraźnych różnic między badanymi gatunkami szalwii. Porównując technikę MGD z zastosowaną wcześniej techniką GMD, wydaje się być słusznym stwierdzenie, iż w omawianym przykładzie ilość całkowicie rozdzielonych plamek jest o wiele mniejsza w porównaniu do ilości uzyskanej przy zastosowaniu techniki GMD. Dlatego też można twierdzić, że technika GMD jest lepszym narzędziem do konstruowania fingerprintów blisko spokrewnionych gatunków roślin, aniżeli technika MGD.

3.2.4. Analiza metanolowych ekstraktów szalwii techniką dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D-TLC)

Korzystnym połączeniem cech obu wcześniej zastosowanych technik (MGD i GMD) jest dwukierunkowa chromatografia cienkowarstwowa (2D-TLC), dzięki której otrzymujemy jeden chromatogram, a nie zestaw kilku chromatogramów. Dlatego też technikę 2D-TLC zastosowano jako jedną z technik w niniejszej pracy. Podczas tej analizy użyto jako adsorbentów polarnych chemicznie związanych faz stacjonarnych, diolowej i cyjanowej. Dla obu tych adsorbentów w pierwszym kierunku rozwijania jako eluent zastosowano mieszaninę izopropanolu i n-heptanu w stosunku objętościowym 30 : 70. Każdą płytkę rozwijano dwukrotnie wymienionym eluentem na całej długości, co miało na celu lepsze rozdzielenie poszczególnych plamek. Zastosowanie w tym przypadku dwukrotnego rozwijania zaowocowało pojawieniem się kolejnej plamki na chromatogramie (Rys. 22.).

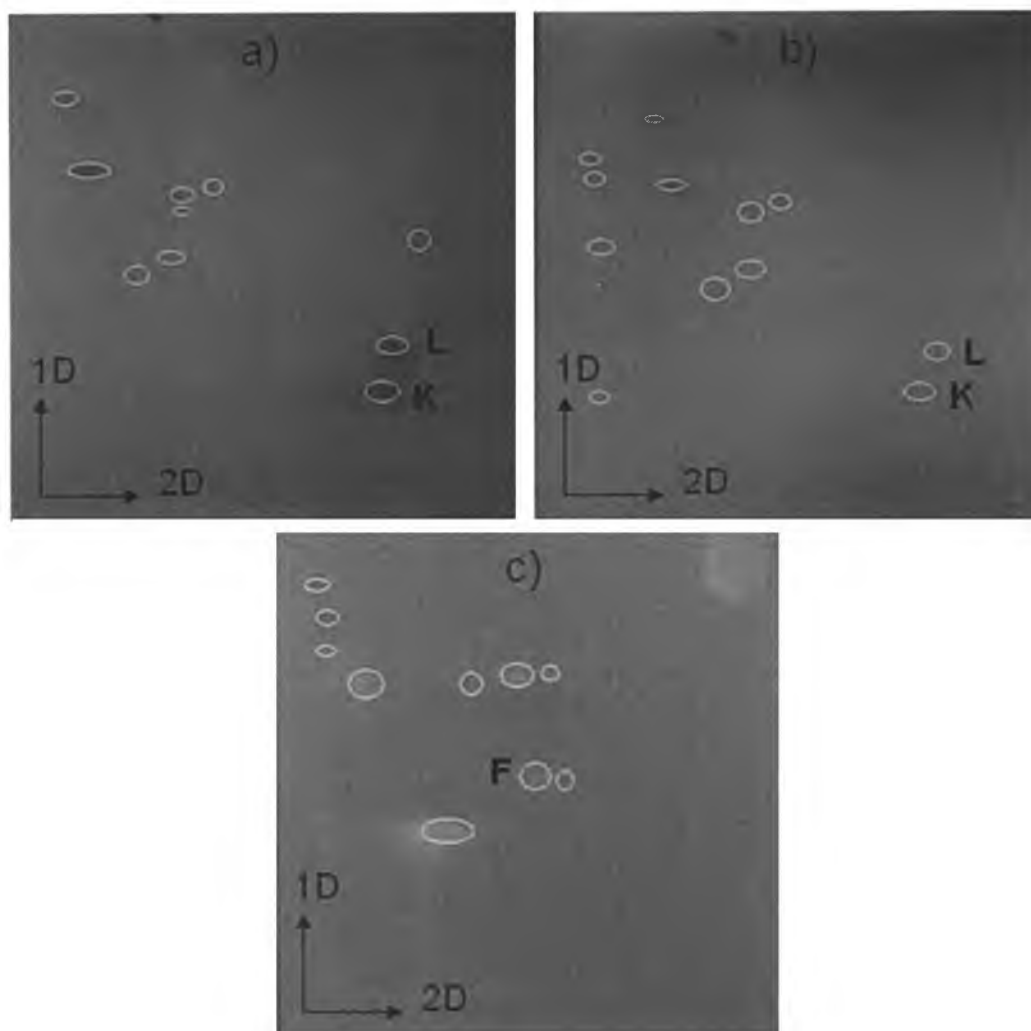


Rys. 22. Zdjęcie chromatogramu dla metanolowego ekstraktu *S. officinalis*, rozwiniętej dwukrotnie w pierwszym kierunku na całej długości. Faza stacjonarna: diol-silica. Faza ruchoma: izopropanol + n- heptan, 30 : 70 (v/v). Odległość rozwijania: 9 cm. Strzałką zaznaczono plamkę, która pojawia się na chromatogramie dopiero po drugim rozwinięciu. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.

Następnie wciąż w tym samym kierunku rozwijania zastosowano mieszaninę izopropanolu, n-heptanu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 78 : 20 : 2. Drogi rozwijania chromatogramów dobrano tak, aby substancje rozdzielone w pierwszych dwóch etapach, pozostały takimi również po trzecim kroku. W drugim, prostopadłym do pierwszego kierunku, chromatogramy rozwijano stosując mieszaninę metanolu, wody oraz kwasu octowego w stosunku objętościowym 10 : 88 : 2.

Porównując rezultaty otrzymane podczas analizy ekstraktów szalwii z zastosowaniem cyjanowych płytek chromatograficznych z wynikami otrzymanymi na płytkach pokrytych adsorbentem diolowym okazało się, że lepszy rozdział uzyskano na adsorbencie typu CN-silica. Otrzymane plamki były na tych płytkach bardziej zwarte i nie ogonowały (Rys. 23 a i b). Wydaje się więc, że w przypadku rozwijania

metanolowych ekstraktów różnych gatunków szalwii, z wykorzystaniem techniki dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej, lepszym wyborem jest zastosowanie adsorbentu cyjanowego, niż adsorbentu diolowego.



Rys. 23. Wideoskany chromatogramów metanolowego ekstraktu szalwii lekarskiej (*S. officinalis*). Fazy stacjonarne: (a) i (b): CN-silica; (c): diol-silica. Fazy ruchome: 1D: (i) i (ii): izopropanol + n-heptan, 30 : 70 (v/v); rozwijanie na wysokość 9 cm; (iii) izopropanol + n-heptan + kwas octowy, 78 : 20 : 2 (v/v) rozwijanie do najniższej plamki rozdzielonej w poprzednim kroku; 2D: metanol + woda + kwas octowy, 10 : 88 : 2 (v/v); rozwijanie na wysokość 9 cm. Rejestracja chromatogramów przy długości fali świetlnej a) $\lambda = 254$ nm; b) i c) $\lambda = 366$ nm. Symbole: F – kwas ferulowy, K – kemferol, L – luteolina. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μ l.

Technika dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej umożliwia rozróżnienie poszczególnych gatunków na podstawie ilości, położenia, koloru oraz intensywności poszczególnych plamek. Zastosowana w tym kroku technika nie jest jednak pozbawiona wad. Granica wykrywalności poszczególnych składników występujących w badanym ekstrakcie jest mniejsza w przypadku techniki dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej, niż techniki jednokierunkowej, co jest spowodowane zmniejszającym się wskutek efektywnej dyfuzji stężeniem próbki przypadającym na jednostkę powierzchni adsorbentu w trakcie dwukierunkowego rozwijania.

3.2.5. Określenie aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów szalwii uzyskanych metodą ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej przy użyciu stabilnego rodnika DPPH

Najobszerniejszą grupą przedstawicieli rodziny *Lamiaceae* są rośliny z rodzaju *Salvia*. Wykazują one szereg właściwości leczniczych, jak np. właściwości spazmolityczne, antyseptyczne, ściągające i antyoksydacyjne [79]. Ostatnio skupiono szczególną uwagę na substancjach wykazujących działanie antyoksydacyjne i jednocześnie rozpuszczalnych w wodzie, występujących w roślinach z rodzaju *Salvia*, które – jak udowodniono – chronią przed chorobami serca i pewnymi postaciami raka [115, 121]. Polifenole roślinne (takie, jak flawonoidy i kwasy fenolowe) mogą działać jako zmiatacze wolnych rodników, lub współdziałać z przeciwutleniaczami, wzmacniając ich działanie przeciwnowotworowe oraz kardioprotekcyjne (efekt synergiczny) [121, 122]. Rośliny z rodzaju *Salvia* są bogatym źródłem polifenoli i do tej pory udało się w nich zidentyfikować ok. 160 substancji biologicznie czynnych [115]. Liczne badania naukowe wykazały, że wolne rodniki, a ściślej – reaktywne formy tlenu (ROS – ang. *Reactive Oxygen Species*) – inicjują nieprawidłowe procesy biochemiczne, co z kolei prowadzi do powstawania wielu chorób, takich, jak miażdżycza, choroba Alzheimer, astma, reumatoidalne zapalenie stawów itd. [123] Z tego powodu antyoksydanty i zmiatacze wolnych rodników stały się obecnie obiektem intensywnych badań [124].

Do określania całkowitej aktywności antyoksydacyjnej skomplikowanych mieszanin (w tym ekstraktów roślinnych) zwykle stosuje się proste techniki spektrofotometryczne, jednakże określenie aktywności antyoksydacyjnej dla każdej substancji z osobna w złożonej mieszaninie jest trudnym zadaniem praktycznym [125, 126, 127]. Do oznaczania pojedynczych antyoksydantów w ekstraktach roślinnych zaproponowano kilka wariantów techniki HPLC w połączeniu z post-kolumnową detekcją chemiczną [124, 128, 129]. Dobra rozdzielczość techniki HPLC, połączona z szybką post-kolumnową derywatyzacją jest największą zaletą takiej metody, jednak niektóre z proponowanych rozwiązań nie zostały nigdy szerzej wykorzystane, co jest najwyraźniej związane z problemami występującymi podczas wykonywania takich analiz [124]. Innym mankamentem omawianego podejścia jest pewne ograniczenie, polegające na możliwości wykonania w określonym czasie zaledwie jednej analizy. Stąd wynika stale rosnąca potrzeba opracowania nowych metod badawczych względem związków o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych.

Chromatografia cienkowarstwowa jest techniką często używaną do badania związków biologicznie czynnych, zawartych w ekstraktach roślinnych. Zaletami tej metody są jej elastyczność, stosunkowo krótki czas analizy oraz możliwość analizowania wielu próbek jednocześnie. Ponadto technika ta jest szczególnie odpowiednia do przeprowadzania detekcji biologicznej, gdyż rozdzielone składniki mieszaniny pozostają unieruchomione na powierzchni adsorbentu, do której mamy bezpośredni dostęp [130]. Dysponujemy również dużą liczbą selektywnych odczynników wywołujących, które mogą być zastosowane dla różnych związków. Kolejną zaletą techniki TLC jest to, że normalny układ faz, stosowany podczas identyfikacji polarnych związków biologicznie czynnych jest często lepszym rozwiązaniem, niż odwrócony układ faz [130].

Technika chromatografii cienkowarstwowej jest wykorzystywana do izolacji i/lub identyfikacji zmiataczy wolnych rodników i przeciwutleniaczy, zawartych zarówno w ekstraktach roślinnych, jak i w żywności. W takim przypadku jako odczynnik wywołujący stosuje się stabilny rodnik DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) [131, 132]. W tym miejscu należy jednak stwierdzić, iż większość

opublikowanych metod, stosowanych w celu określania rzeczywistego potencjału antyoksydacyjnego nie została jeszcze w pełni wykorzystana, ani nawet do końca przebadana. Wobec powyższego istnieje pilna potrzeba opracowywania odpowiednich metod TLC, umożliwiających określanie potencjalnych właściwości antyoksydacyjnych substancji obecnych w próbkach pochodzenia naturalnego.

Zazwyczaj ekstrakty roślinne są skomplikowanymi mieszaninami, zawierającymi setki substancji, jednak tylko niektóre z nich wykazują istotne działanie biologiczne. Dla kontroli jakości leków ziołowych ważne jest, aby uzyskać jak najwięcej informacji na temat badanej próbki [133]. Podczas ustalania autentyczności i jakości leków ziołowych w pierwszym rzędzie brane są pod uwagę ich profile chromatograficzne (fingerprinty) oraz najbardziej aktywne składniki tych leków [134].

W eksperymencie przedstawionym w niniejszej pracy 19 gatunków szalwii poddano analizie mającej na celu określenie aktywności antyoksydacyjnej (Tab. 22). Frakcje o różnej polarności badano pod kątem obecności związków o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych. Główną zaletą przedstawionej metody jest szybki czas analizy oraz możliwość przedstawienia wyników w formie obrazów. Według naszej wiedzy, określanie aktywności antyoksydacyjnej przy użyciu fingerprintów pochodzących z chromatografii cienkowarstwowej nie zostało dotychczas wykorzystane do kontroli jakości leków ziołowych.

Tab. 22. Wykaz gatunków szalwii poddanych określaniu aktywności antyoksydacyjnej

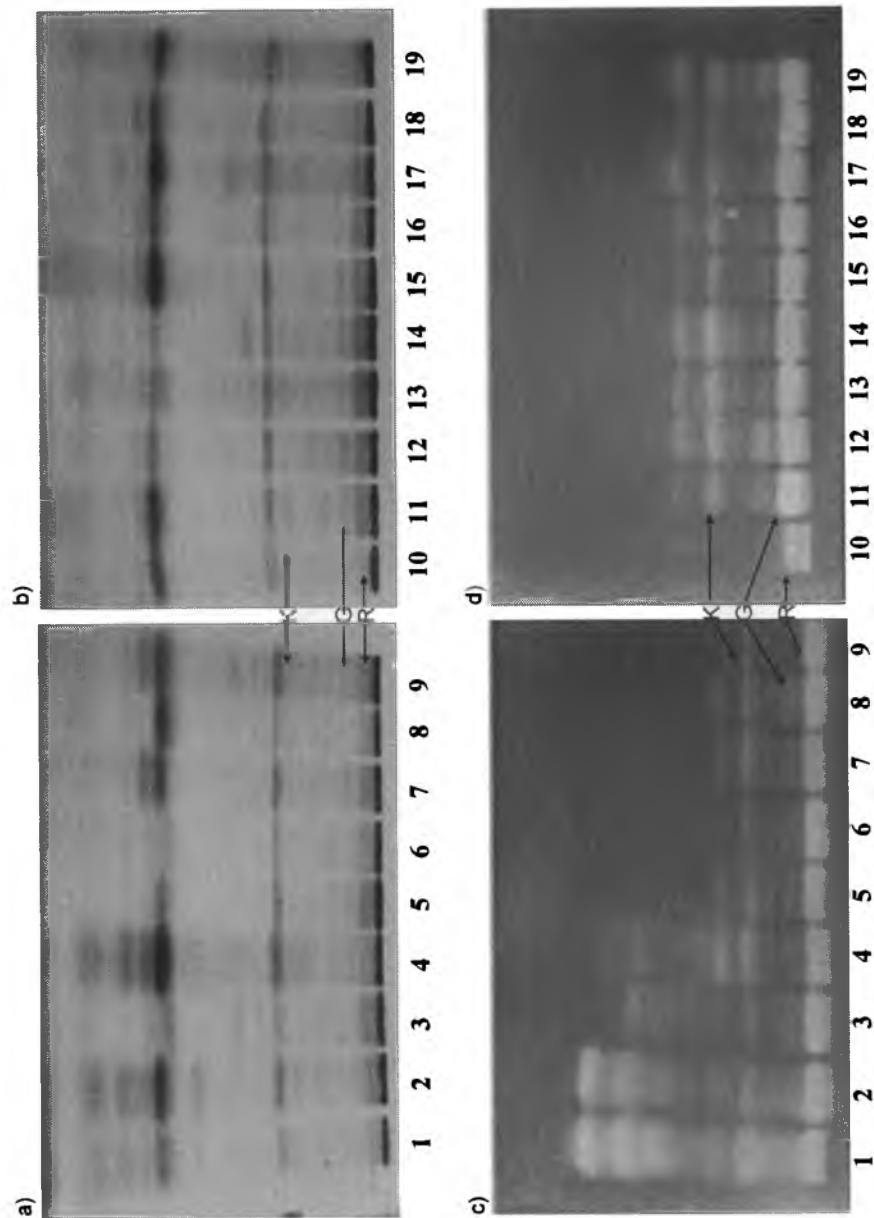
Nr	Gatunek
1	<i>S. officinalis</i>
2	<i>S. triloba</i>
3	<i>S. canariensis</i>
4	<i>S. lavandulifolia</i>
5	<i>S. forskahlei</i>
6	<i>S. sclarea</i>
7	<i>S. verticillata</i>
8	<i>S. pratensis ssp. Haematodes</i>
9	<i>S. tesquicola</i>
10	<i>S. deserta</i>
11	<i>S. hians</i>
12	<i>S. cadmica</i>
13	<i>S. glutinosa^a</i>
14	<i>S. atropatana</i>
15	<i>S. azurea</i>
16	<i>S. staminea</i>
17	<i>S. jurisicii</i>
18	<i>S. amplexicaulis</i>
19	<i>S. nemorosa</i>

Pierwszy etap badań dotyczył opracowania fingerprintów chromatograficznych, częściowo opierając się na wynikach uzyskanych wcześniej (rozdz. 3.2.1.). Z uwagi na to, że metanol zastosowany do ekstrakcji dostarcza zbyt złożonej mieszaniny składników, w niniejszych badaniach wykorzystano dwa różne układy faz ruchomych, odpowiednie dla frakcji związków o zróżnicowanym spektrum polarności. Dla frakcji związków nisko polarnych zastosowano układ rozpuszczalników (1), natomiast

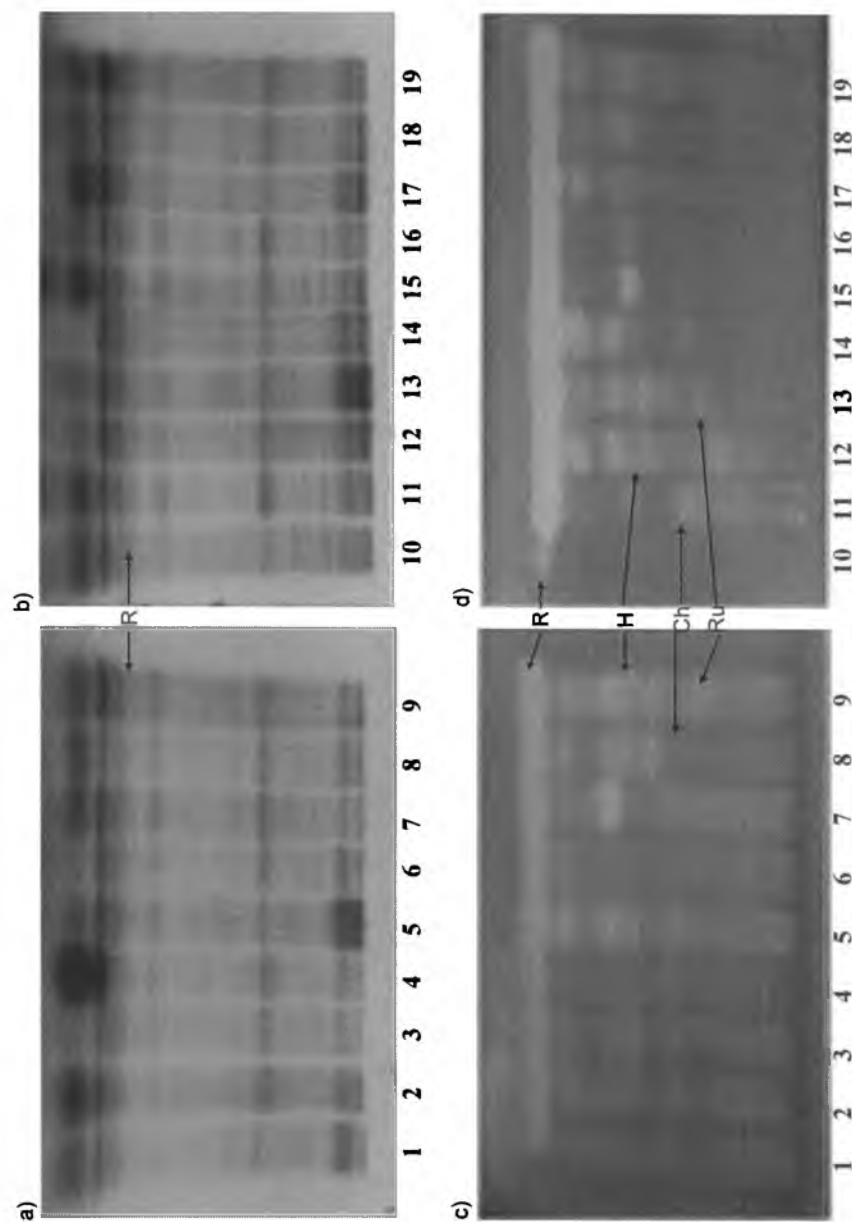
dla frakcji związków semi- i wysoko polarnych użyto układu rozpuszczalników (2). Prócz tego przetestowano cały szereg odczynników wywołujących, jednak najlepszym okazał się roztwór 1 grama waniliny w 20% metanolemowym roztworze kwasu siarkowego(VI). Wywoływacz ten okazał się szczególnie korzystny w przypadku związków semi- i wysoko polarnych, ujawniając znaczną liczbę rozdzielonych pasm chromatograficznych. W ten sposób udało się zidentyfikować w analizowanych ekstraktach kwasy rozmarynowy, galusowy i kawowy. Dla wszystkich analizowanych gatunków szalwii (z wyjątkiem gatunku *S. deserta*) układ pasm obecnych między linią startu a pasmem o wartości $R_F = 0,33$ jest niemal identyczny i może być uznany za charakterystyczny dla rodzaju *Salvia*. Dwa kolejne pasma o wartościach $R_F = 0,63$ i $0,67$ również są obecne na chromatogramach wszystkich badanych gatunków szalwii. Układy pasm chromatograficznych różnicujące poszczególne gatunki szalwii pojawiają się dopiero w zakresie niższych wartości R_F na chromatogramach frakcji związków nisko polarnych, uzyskanych przy pomocy fazy ruchomej (1).

Zastosowanie układu rozpuszczalników (2), charakteryzującego się stosunkowo wysoką mocą elucyjną pozwoliło rozdzielić związki semi- i wysoko polarne, do których zaliczają się bardziej polarne kwasy fenolowe i różne glikozydy i aglikony flawonoidowe. Dla większości gatunków szalwii fingerprinty uzyskane przy użyciu zastosowanego odczynnika wywołującego były bardzo zbliżone. Ich cechą charakterystyczną była obecność kilku ciemnych pasm w niższym zakresie wartości R_F , co mogło być spowodowane obecnością bardzo polarnych glikozydów. Intensywne, ciemne pasmo o wartości $R_F = 0,06$ pojawia się na chromatogramach następujących gatunków szalwii: *S. officinalis*, *S. forskahlei*, *S. glutinosa* i *S. jurisicii*. Jak wynika z obrazu chromatogramów przedstawionych na rysunku 25, wymienione wyżej gatunki szalwii charakteryzują się stosunkowo mniejszą liczbą rozdzielonych pasm chromatograficznych, niż pozostałe, analizowane gatunki. Być może te ciemne pasma powstały wskutek rozpadu odpowiednich glikozydów w trakcie suszenia materiału roślinnego. Cztery pasma chromatograficzne o wartościach R_F równych $0,10$, $0,31$, $0,76$ i $0,80$, które są obecne na wszystkich chromatogramach można uznać za charakterystyczne dla rodzaju *Salvia*.

Drugi etap niniejszych badań dotyczył określania zdolności do wygaszania wolnych rodników przez rozdzielone w pierwszym etapie frakcje ekstraktów szalwii. W tym celu płytki wywoływano metanolemowym 0,2% roztworem DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Substancje posiadające zdolność do wygaszania wolnych rodników ujawniły się na chromatogramach w postaci żółtych pasm na fioletowym tle. W przypadku nisko polarnej frakcji większość przebadanych gatunków charakteryzowała się bardzo zbliżonymi profilami wolnych rodników, wykazując cztery pasma o wartościach R_F odpowiednio $0,06$, $0,12$, $0,22$ i $0,41$. We frakcji tej zidentyfikowano trzy wolne kwasy fenolowe, tj. kwas rozmarynowy, galusowy i kawowy, jako posiadające właściwości zmiataczy wolnych rodników. W przypadku wszystkich gatunków szalwii najsilniejszy potencjał antyoksydacyjny wykazał kwas rozmarynowy. Wniosek taki można wyprowadzić na podstawie wielkości zaobserwowanych po wywołaniu żółtych pasm, odpowiadających temu właśnie kwasowi. Również w przypadku gatunków *S. officinalis* i *S. atropatana* silny potencjał antyoksydacyjny wykazał kwas kawowy. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z rezultatami pracy [115]. Najmniejszą aktywność antyoksydacyjną wykazał ekstrakt *S. deserta*. W tym przypadku ujawnione zostało tylko jedno żółte pasmo chromatograficzne, odpowiadające kwasowi rozmarynowemu.



Rys. 24. Chromatogramy dziewiętnastu badanych gatunków szalwii (*Salvia sp.*). Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: układ rozpuszczalników (1). Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: a) i b) 1g waniliny + 20% metanolowy roztwór kwasu siarkowego(VI); c) i d) 0,2% metanolowy roztwór DPPH. Chromatogramy fotografowano po 30 minut od zakończonej derywatyzacji. Zdjęcia wykonane w świetle widzialnym. Numery umieszczone pod zdjęciami odpowiadają gatunkom szalwii w tabeli 22. Symbole: K – kwas kawowy, G – kwas galusowy, R – kwas rozmarynowy. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .



Rys. 25. Chromatogramy dziewiętnastu badanych gatunków szatwii (*Salvia sp.*). Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: układ rozpuszczalników (2). Odległość rozwijania: 9 cm. Odczynnik wywołujący: a) i b) 1g waniliny + 20% metanolowy roztwór kwasu siarkowego(VI); c) i d) 0,2% metanolowy roztwór DPPH. Chromatogramy sfotografowano po 30 minut od zakończonej derywatywacji. Zdjęcia wykonane w świetle widzialnym. Numery umieszczone pod zdjęciami odpowiadają gatunkom szatwii w tabeli 22. Symbole: R – kwas rozmarynowy H – hiperozyd, Ch – kwas chlorogenowy, Ru – rutyna. Ekstrakty nakraplano w ilości 10 μl .

Chromatogramy nisko polarnych frakcji uzyskanych dla czterech gatunków szalwii, tj. dla *S. officinalis*, *S. triloba*, *S. lavandulifolia* i *S. canariensis* charakteryzowały się stosunkowo większą liczbą pasm o właściwościach antyoksydacyjnych, dla wartości R_F odpowiednio 0,57, 0,70 i 0,74. Gatunki *S. officinalis* i *S. triloba* cechowały się najwyższą zawartością związków o potencjalnej aktywności antyoksydacyjnej. Wydaje się, że ze względu na zbliżony skład chemiczny ekstraktów oraz na podobny potencjał antyoksydacyjny obu tych gatunków, *S. triloba* może być dobrym kandydatem na uznany lek ziołowy. Za taką propozycją w szczególności przemawia stosunkowo niższa, niż dla *S. officinalis*, zawartość α - i β -tujonu (czyli związków o właściwościach neurotoksycznych) [135, 136]. Wcześniejsze doniesienia wskazywały, iż potencjał antyoksydacyjny ekstraktów roślin z rodziny szalwii w głównej mierze należy przypisać obecności polarnych związków fenolowych, np. kwasowi rozmarynowemu, galusowemu i kawowemu, gdy tymczasem wyniki niniejszych badań wskazują, że podobne właściwości mogą wykazywać również związki zawarte we frakcji nisko polarnej.

Z uwagi na to, że w przypadku użycia nisko polarnego układu rozpuszczalników (1) znajdujące się na starcie pasma również wykazały intensywnie żółte zabarwienie, dla rozdzielenia frakcji średnio- i wysoko polarnych zastosowano eluent (2), charakteryzujący się większą mocą elucyjną. W tym przypadku zidentyfikowano następujące związki chemiczne o wyraźnych właściwościach antyoksydacyjnych: kwas chlorogenowy ($R_F = 0,36$), kwas rozmarynowy ($R_F = 0,70$), hiperozyd ($R_F = 0,43$) i rutynę ($R_F = 0,28$). Ogólnie można stwierdzić, że w przypadku zastosowania układu rozpuszczalników (2) najliczniejsze żółte pasma (o zabarwieniu wskazującym na właściwości antyoksydacyjne), obecne praktycznie na wszystkich chromatogramach, pojawiły się w wyższych zakresach wartości R_F . Jest to obszar frakcji stosunkowo mniej polarnych, co może wskazywać na obecność w tych pasmach glikozydów związków fenolowych. Wyniki te nie wydają się potwierdzać stwierdzenia zawartego w pracy [121], iż glikozydy posiadają niższy potencjał antyoksydacyjny, niż aglikony. Obecność największej ilości antyoksydantów stwierdzono w średnio i wysoko polarnej frakcji, wyodrębnionej z gatunków *S. forskahlei*, *S. tesquicola*, *S. cadmica*, *S. glutinosa*, *S. atropatana* i *S. nemorosa*. Z kolei najniższą aktywność antyoksydacyjną stwierdzono w analogicznych frakcjach, uzyskanych z gatunków *S. lavandulifolia*, *S. sclarea*, *S. azurea* i *S. staminea*. W przypadku gatunku *S. deserta* na chromatogramie zidentyfikowano jedynie pasmo pochodzące od kwasu rozmarynowego.

3.3. Konstrukcja i analiza binarnych fingerprintów metanolowych ekstraktów wybranych roślin z rodzaju *Salvia* technikami HPLC-DAD i HPLC-ELSD

Niniejszy rozdział zawiera przykład konstrukcji binarnych fingerprintów sześciu wybranych gatunków szalwii (Tab. 23), uzyskanych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem dwóch różnych detektorów, tj. detektora fotodiodowego (DAD) oraz fotodyspersyjnego detektora laserowego (ELSD).

Konstrukcja fingerprintów jest popularną metodą wykorzystywaną m.in. do kontroli jakości leków ziołowych, ponieważ umożliwia uzyskanie wielu ważnych informacji na temat analizowanego materiału roślinnego. Procedury dotyczące zarówno kontroli jakości, jak również standaryzacji preparatów ziołowych zalecają stosowanie do konstrukcji charakterystycznych fingerprintów m.in. takich technik separacji, jak chromatografia cienkowarstwowa (TLC), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC), elektroforeza kapilarna oraz chromatografia przeciwpądowa (HSCCC – ang. High - Speed Counter - Current Chromatography) [120, 137-149].

Dzięki szybkiemu rozwojowi nauki i techniki oraz rosnącej tendencji do stosowania względem leków pochodzenia naturalnego tzw. fingerprintowania w przyszłości będzie można wykorzystywać do tego celu również inne narzędzia analityczne. Obecnie konstrukcja fingerprintów charakterystycznych dla wszelkiego rodzaju wyciągów roślinnych jest najpopularniejszą strategią w szybkiej analizie porównawczej materiału roślinnego. Wynika to przede wszystkim z ograniczeń, jakie niesie za sobą pełna identyfikacja substancji zawartych w roślinach. Główny problem próbek pochodzenia roślinnego stanowi ich nieznan skład chemiczny i w tym miejscu należałoby postawić pytanie, czym jest on spowodowany. Otóż przyczyn jest kilka, a jedną z nich jest brak odpowiednich substancji wzorcowych. Wiele związków naturalnie występujących w materiale roślinnym nie zostało jeszcze zidentyfikowanych ani zsyntezowanych w warunkach laboratoryjnych i w ten sposób z powodu ich braku koło się zamyka. Kolejnym problemem związanym z identyfikacją związków pochodzenia roślinnego są stosunkowo wysokie koszty związane z zakupem dostępnych substancji wzorcowych, których i tak w większości przypadków należałoby dokonać na „chybił trafił”, licząc na ich obecność w badanych próbkach.

Fingerprinty, tj. profile chromatograficzne ekstraktów roślinnych mogą stanowić wystarczające źródło m.in. do różnicowania roślin, ich chemotaksonomicznego porównania oraz identyfikacji w obrębie danej rodziny. Dynamiczny rozwój technik detekcyjnych sprzężonych z chromatografią cieczową powoduje, że jakość otrzymywanych fingerprintów stale rośnie.

Tab. 23. Wykaz gatunków szalwii poddanych binarnemu fingerprintowaniu oraz ich okresy wegetacyjne

Nr	Gatunek szalwii	Rok zbioru
1	<i>Salvia officinalis</i>	2007
1a	<i>Salvia officinalis</i>	2008
2	<i>Salvia officinalis</i> ^(a)	2008
3	<i>Salvia jurisicii</i>	2007
3a	<i>Salvia jurisicii</i>	2008
4	<i>Salvia triloba</i>	2007
4a	<i>Salvia triloba</i>	2008
5	<i>Salvia azurea</i>	2007
5a	<i>Salvia azurea</i>	2008
6	<i>Salvia forskaohlei</i>	2007
6a	<i>Salvia forskaohlei</i>	2008
7	<i>Salvia nemorosa</i>	2007
7a	<i>Salvia nemorosa</i>	2008

^a ze stanowiska naturalnego w Zlatiborze, Serbia

Dokonując przeglądu literatury naukowej można znaleźć kilka przykładów konstrukcji fingerprintów roślin z rodzaju *Salvia*, niemniej jednak większość z tych prac koncentruje się na tworzeniu profili chromatograficznych dla gatunku *Salvia miltiorrhiza*, który jest tradycyjnym chińskim lekiem ziołowym, stosowanym w leczeniu choroby wieńcowej serca, zapalenia wątroby, czy bezsenności [119,142,143,148,150]. Jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, w literaturze nie odnaleziono jednak żadnych zastosowań metod chromatograficznych do analizy porównawczej różnych gatunków szalwii, szczególnie tych występujących na obszarze Europy. Wśród różnych metod analizy techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej substancji biologicznie czynnych występujących w roślinach z rodzaju

Salvia, najczęściej używany jest detektor fotodiodowy (DAD). Równie popularnym sposobem detekcji jest stosowanie spektrometru masowego (MS). Stosunkowo niedawno dużym zainteresowaniem zaczął cieszyć się wysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony jednocześnie z detektorem fotodiodowym i fotodyspersyjnym detektorem laserowym. Takie połączenie wydaje się być szczególnie przydatne do rutynowych analiz i kontroli jakości leków pochodzenia naturalnego, gdyż umożliwia uzyskanie binarnych fingerprintów [119, 151-156].

Zasada działania detektora DAD opiera się na pomiarze absorpcji promieniowania UV rozdzielanych składników, zawierających grupy chromoforowe. Odpowiedź tego selektywnego detektora jest proporcjonalna do zdolności danego składnika do pochłaniania promieniowania UV. Ten nowej generacji detektor z matrycą fotodiodową ma ustaloną optykę i układ detekcyjny składający się z dwóch lub więcej szeregów fotodiod umieszczonych na półprzewodnikowej płytce krzemowej, która jest tak ustawiona, aby odbierać promieniowanie rozproszone przez siatkę dyfrakcyjną. Dzięki temu chromatogram można obserwować przy różnych długościach fali, a widma absorpcji poszczególnych składników próbki można porównać z widmami wzorców [157].

Z kolei detektor ELSD jest detektorem uniwersalnym, który może być stosowany w układach przepływowych do oznaczania substancji wykazujących mniejszą lotność, niż składniki fazy ruchomej. Działanie detektora przedstawia się następująco: eluat uwalniany z kolumny jest rozpylany dwutlenkiem węgla w podgrzanym do odpowiedniej temperatury nebulizatorze. Następuje odparowanie rozpuszczalnika, a nielotne składniki rozdzielanej próbki tworzą areozol, który jest następnie transportowany w strumieniu dwutlenku węgla do celi komory pomiarowej, gdzie cząsteczki areozolu powodują raileighowskie rozproszenie światła emitowanego przez laser. Następnie rozproszone promieniowanie dociera do fotopowielacza, gdzie po wzmocnieniu jego prąd rejestrowany jest w postaci chromatogramu. Odpowiedź detektora jest proporcjonalna do masy substancji rozpuszczonej w próbce [158, 159].

Podsumowując, detektor DAD pozwala na detekcję substancji pochłaniających promieniowanie UV, podczas gdy detektor ELSD umożliwia detekcję wszystkich nielotnych związków i zapewnia stabilne warunki analizy nawet w przypadku elucji gradientowej. Tak więc wykorzystanie obu wymienionych detektorów w trakcie jednej analizy umożliwia uzyskanie wzajemnie uzupełniających się informacji na temat badanej próbki.

Aby lepiej poznać zalety równoległego wykorzystania w analizie fitochemicznej obu detektorów starannie wybrano sześć gatunków szalwii. Jako materiał odniesienia wybrano gatunek *Salvia officinalis*, ze względu na jego uznany potencjał leczniczy oraz ugruntowaną pozycję w tradycyjnej medycynie europejskiej. Pozostałych pięć gatunków wyselekcjonowano na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań. Gatunki *Salvia jurisicii* oraz *Salvia triloba* wykazały stosunkowo dużą zawartość składników (głównie związków fenolowych) w ekstraktach metanolowych, a ponadto ich profile chromatograficzne przypominały profil *S. officinalis* [160]. Z kolei pozostałe trzy wybrane gatunki szalwii, tj. *Salvia azurea*, *Salvia forskahlei* i *Salvia nemorosa* charakteryzowały się stosunkowo niewielką zawartością wzmiankowanych składników w ekstraktach metanolowych.

Porównanie binarnych fingerprintów uzyskanych przy użyciu detektorów DAD i ELSD dla tych próbek szalwii, o których było wiadomo, że różnią się składem chemicznym okazało się szczególnie interesujące. Na wybranych przykładach omówiono zalety binarnego fingerprintowania, a uzyskane w tym eksperymencie dane posłużyły do porównania składu chemicznego wybranych gatunków szalwii, zebranych

w dwóch okresach wegetacyjnych (2007 i 2008). Z kolei użyte w analizie substancje wzorcowe posłużyły do identyfikacji i ilościowego oszacowania zawartości związków w metanolowych ekstraktach badanych gatunków roślin. Częściową identyfikację składników zawartych w ekstraktach sześciu wybranych gatunków szalwii przeprowadzono w oparciu o czternaście substancji wzorcowych, które zestawiono w tabeli 24. W tym miejscu należy jednak podkreślić, że większość z użytych substancji stanowiły wzorce drugorzędowe lub o czystości odczynnikowej, które zgodnie z zaleceniami producenta powinny być używane w pierwszej fazie opracowywania metody analitycznej oraz stosowane jako wzorzec wewnętrzny lub roboczy, po porównaniu go z wzorcami wyższego rzędu. Tak więc, mimo wykreślenia krzywych kalibracji opartych na ośmiu różnych stężeniach substancji wzorcowych, uzyskane wyniki mogą być uznane jedynie za ilościowe.

Tab. 24. Wykaz substancji wzorcowych wykorzystanych podczas analizy ekstraktów szalwii techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej wraz z ich czasami retencji (t_R)

Nr.	Substancja wzorcowa	Czas retencji, t_R [min]
1	Kwas chlorogenowy	5,57
2	Kwas protokatechowy	5,92
3	Eskuletyna	6,41
4	Kwas kawowy	6,48
5	Skopoletyna	7,47
6	Kwas <i>trans-p</i> -kumarowy	7,76
7	Kwas ferulowy	7,84
8	Kwas rozmarynowy	7,85
9	Kumaryna	10,01
10	Kwas o-kumarowy	10,73
11	Luteolina	16,55
12	Kwas galusowy	16,56
13	Kemferol	16,57
14	Kwas <i>trans</i> -cynamonowy	18,04

Współczynniki korelacji uzyskanych krzywych kalibracji wynosiły od 0,990 do 0,995, a odpowiadające im wartości odchylenia standardowego każdorazowo wynosiły poniżej 2%. Wartości LOD i LOQ dla każdej substancji zawartej w ekstraktach badanych gatunków szalwii wynosiły odpowiednio 0,2 i 1,0 mg na 100g suchego materiału roślinnego. Ze względu na porównawczy charakter przeprowadzonego eksperymentu nie oszacowano odzysków zidentyfikowanych substancji, lecz założono, że były one równe dla wszystkich badanych próbek szalwii. W tabeli 25 umieszczono informacje dotyczące identyfikacji czternastu różnych substancji oraz ilościowe oszacowanie ich zawartości w każdym z badanych ekstraktów szalwii.

Tab. 25. Identyfikacja i ilościowe porównanie zawartości kwasów fenolowych, flawonoidów i kumaryny dla sześciu wybranych gatunków szalwii zebranych w dwóch okresach wegetacyjnych (2007 i 2008)

Gatunek	Rok	Substancja wzorcowa													
		Kwas chlorogenowy	Kwas protokatechowy	Esuletyna	Kwas kawowy	Skopoletyna	Kwas trans-p-kumarowy	Kwas ferulowy	Kwas rozmarynowy	Kumaryna	Kwas o-kumarowy	Luteolina	Kwas galusowy	Kemferol	Kwas trans-cynanomonowy
		Nr													
		Zawartość [g na 100g suchego materiału roślinnego]													
Salvia azurea	2007	0,146	0,081	n.w.	0,098	0,072	0,006	n.w.	n.w.	0,002	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,000
	2008	0,209	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,081	n.w.	0,193	0,008	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
Salvia forskaohlei	2007	0,101	0,033	n.w.	0,060	n.w.	0,071	n.w.	n.w.	0,004	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
	2008	0,114	n.w.	n.w.	0,031	n.w.	n.w.	n.w.	0,228	0,007	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,001
Salvia jurisicii	2007	0,104	n.w.	n.w.	0,018	0,054	n.w.	n.w.	0,058	0,007	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
	2008	0,129	n.w.	n.w.	n.w.	0,056	n.w.	n.w.	0,030	0,008	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
Salvia nemorosa	2007	0,081	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.	0,153	0,005	0,008	n.w.	n.w.	n.w.	0,000
	2008	0,116	n.w.	n.w.	0,054	0,238	n.w.	n.w.	0,251	0,007	0,013	n.w.	n.w.	n.w.	0,001
Salvia officinalis	2007	0,141	0,037	n.w.	0,091	n.w.	n.w.	n.w.	0,210	0,004	0,022	n.w.	n.w.	n.w.	0,001
	2008	0,075	0,021	n.w.	0,031	n.w.	0,042	n.w.	0,139	n.w.	n.w.	n.w.	0,014	n.w.	n.w.
Salvia triloba	2008 ^(a)	0,135	n.w.	n.w.	0,012	n.w.	n.w.	n.w.	0,163	0,016	0,033	0,002	n.w.	n.w.	0,001
	2007	0,110	n.w.	n.w.	0,081	n.w.	0,069	n.w.	0,211	n.w.	0,016	n.w.	n.w.	n.w.	0,001
	2008	0,102	n.w.	n.w.	0,052	n.w.	0,241	n.w.	0,282	n.w.	n.w.	0,001	n.w.	n.w.	0,000

^a ze stanowiska naturalnego w Zlatiborze, Serbia

n.w. – nie wykryto

■ – najwyższa zawartość zidentyfikowanej substancji

■ – najniższa zawartość zidentyfikowanej substancji

Analizując otrzymane dane stwierdzono, że w każdej z badanych próbek brak trzech związków wzorcowych, tj. eskuletyny, kwasu ferulowego oraz kumferolu, niemniej jednak nie musi to oznaczać ich absolutnego braku. Istnieją co najmniej dwa powody, dla których substancje te nie zostały wykryte, a potencjalnie mogą znajdować się w analizowanych gatunkach szalwii. Mianowicie, wyodrębnione ilości omawianych związków mogły znaleźć się poniżej progu LOD zastosowanej techniki analitycznej i/lub wszystkie te trzy substancje mogły znajdować się w ekstrakcie w związanej formie (np. jako glikozydy i/lub estry). Podstawą takich założeń był fakt, iż badane ekstrakty metanolowe nie zostały poddane procesowi hydrolizy, zatem żadne zawarte w nich glikozydy i/lub estry nie zostały uwolnione do postaci odpowiednich aglikonów.

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono obecność we wszystkich badanych gatunkach szalwii, następujących substancji: kwasu chlorogenowego, kwasu kawowego oraz kwasu rozmarynowego. Z kolei kumarynę wykryto we wszystkich gatunkach szalwii z wyjątkiem *S. triloba*, a śladowe ilości kwasu cynamonowego (często na poziomie pomiędzy LOD, a LOQ) wykryto we wszystkich badanych gatunkach z wyjątkiem *S. jurisicii*. Z drugiej strony kwas galusowy zidentyfikowano jedynie w ekstrakcie *S. officinalis*, a luteolinę w próbce *S. triloba* oraz próbce *S. officinalis* pochodzącej ze stanowiska naturalnego, położonego na obszarze południowo-zachodniej Serbii. Kwas protokatechowy zidentyfikowano w wyciągach gatunków *S. azurea*, *S. forskahlei* i *S. officinalis*, a skopoletynę wykryto w ekstraktach gatunków *S. azurea*, *S. jurisicii* oraz *S. nemorosa*. Obecność kwasu *o*-kumarowego stwierdzono w próbkach *S. nemorosa*, *S. officinalis* oraz *S. triloba*, natomiast kwasu *trans-p*-kumarowego w *S. azurea*, *S. forskahlei*, *S. officinalis* i *S. triloba*. Gatunkami o najwyższej zawartości siedmiu zidentyfikowanych substancji okazały się *S. nemorosa* i *S. officinalis*, przy czym oba gatunki zostały zebrane w 2008 roku. Z chemotaksonomicznego punktu widzenia warto także zauważyć, że wszystkie substancje (z wyjątkiem luteoliny) zidentyfikowane w ekstrakcie *S. officinalis* pochodzącej ze stanowiska naturalnego położonego na obszarze Serbii były takie same, jak w wyciągach gatunków wyhodowanych w Ogrodzie Roślin Leczniczych w Lublinie.

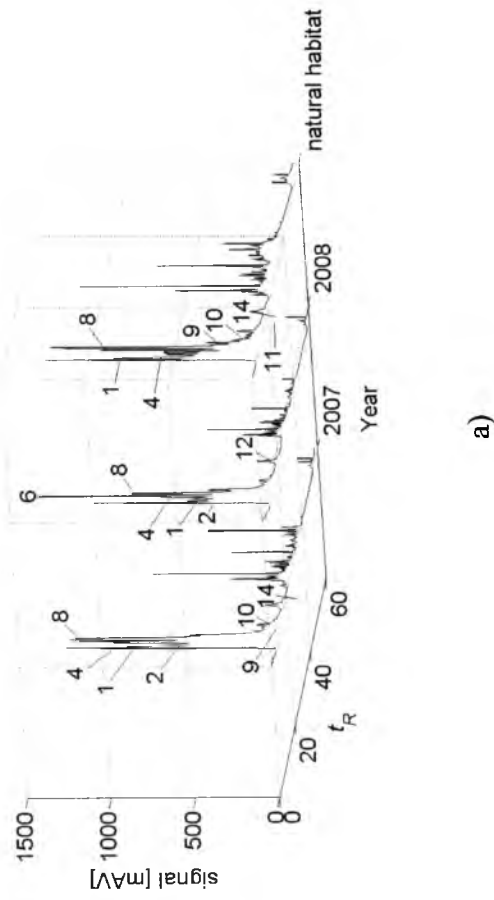
Na podstawie informacji zawartych w tabeli 25 można również wyciągnąć pewne wnioski odnośnie do sezonowych różnic w badanych próbkach szalwii, jednak niemożliwym było zdefiniowanie prawidłowości w tym zakresie. Część ekstraktów charakteryzowała się wyższą zawartością oznaczanych substancji dla gatunków szalwii zebranych w 2008 roku, z kolei pozostała część wykazywała wyższą zawartość związków dla gatunków zebranych w 2007 roku. Jednym, choć z pewnością nie jedynym powodem braku występowania regularności w sezonowych różnicach może być różny czas zbioru roślin (w 2007 roku zioła zbierano w sierpniu, natomiast w 2008 roku w czerwcu).

Głównym celem przeprowadzonej analizy było porównanie binarnych fingerprintów sześciu wybranych gatunków szalwii, zarejestrowanych przy użyciu dwóch różnych detektorów. Chromatogramy uzyskane przy zastosowaniu selektywnego detektora DAD zawierają informacje wyłącznie o substancjach pochłaniających promieniowanie UV, natomiast chromatogramy otrzymane przy użyciu uniwersalnego detektora ELSD przedstawiają dane o całkowitym składzie badanych próbek. Mając to na uwadze należy się spodziewać, iż fingerprinty zarejestrowane przy pomocy detektora ELSD będą bogatsze zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym. Na rysunkach 26-31 przedstawiono chromatogramy metanolowych ekstraktów sześciu wybranych gatunków szalwii zebranych w 2007 i 2008 roku otrzymane przy zastosowaniu dwóch różnych metod detekcji.

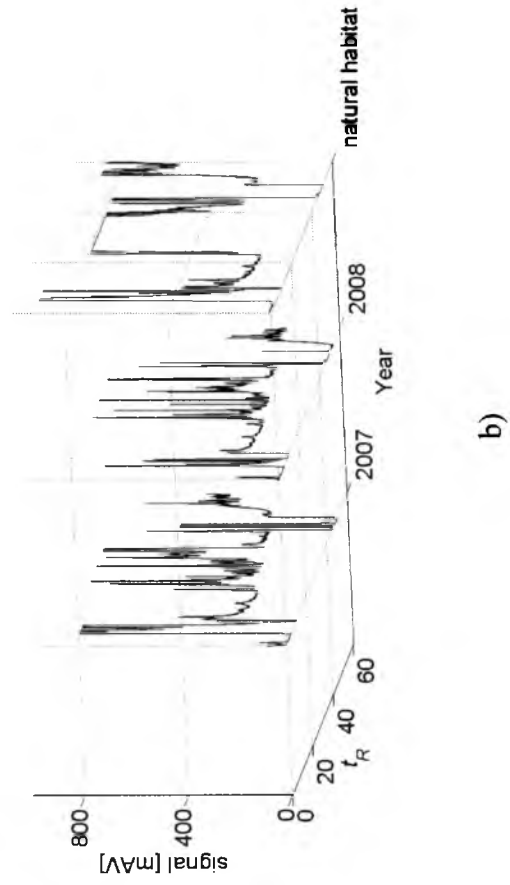
Ilość nastrzykiwanej próbki nie została dobrana dla każdego detektora z osobna, gdyż na tym etapie naczelnym celem było porównanie różnych metod detekcji. Skutkiem tego widoczne są przeładowania stężeniowe układu chromatograficznego na chromatogramach otrzymanych przy zastosowaniu detektora ELSD, świadczące wszelako o jego uniwersalności.

Na podstawie porównania binarnych fingerprintów można wysnuć kilka ogólnych wniosków. Po pierwsze, mimo widocznych różnic sezonowych, dla każdego z badanych gatunków szalwii udało się uzyskać charakterystyczne fingerprinty. Po drugie fingerprinty zarejestrowane przy pomocy detektora ELSD zawierają więcej informacji o analizowanych próbkach, niż te zarejestrowane przy pomocy detektora DAD. Jednakże bardziej szczegółowe informacje o składzie badanych próbek zawarte na chromatogramach uzyskanych przy zastosowaniu detektora ELSD, mogą w niektórych przypadkach prowadzić do pomyłek (np. wówczas, kiedy do identyfikacji stosuje się drugorzędowe substancje wzorcowe). Dla kilku drugorzędowych substancji wzorcowych na chromatogramach zarejestrowanych przy pomocy detektora DAD widoczny jest tylko jeden pik, natomiast na chromatogramach uzyskanych przy zastosowaniu detektora ELSD widoczne są dwa lub nawet trzy piki. W takiej sytuacji bez użycia detektora DAD byłoby praktycznie niemożliwym określenie, który z pików na chromatogramie uzyskanym przy zastosowaniu detektora ELSD naprawdę odpowiada substancji wzorcowej, a który jego zanieczyszczeniem.

Wizualne porównanie chromatogramów tak złożonych próbek, jakimi są ekstrakty pochodzenia roślinnego jest w większości przypadków niewystarczające. Aby wydobyć istotne informacje potrzebna jest analiza chemometryczna, co wykazano już we wcześniejszych badaniach [161]. Zatem dalsze prace mające na celu stworzenie podstaw do chemotaksonomicznej klasyfikacji różnych gatunków szalwii z pewnością będą związane z konstrukcją binarnych fingerprintów i z ich analizą technikami chemometrycznymi.

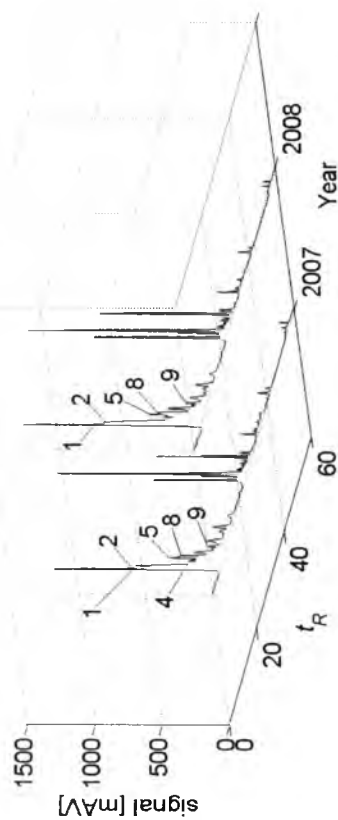


a)

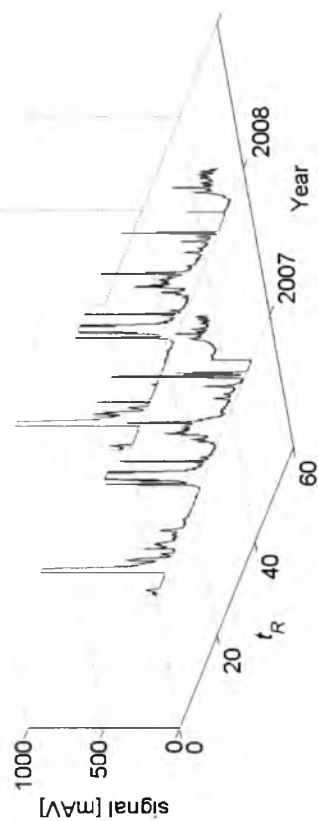


b)

Rys. 26. Porównanie chromatogramów metanolicznych ekstraktów *S. officinalis* zebranej w 2007 i 2008 roku przy pomocy dwóch różnych metod detekcji: a) detektor fotodiody (DAD) i b) detektor ELSD (chromatograf cieczowy Varian 920-LC, kolumna Varian, typu Pursuit C18; wymiary 250 mm \times 4,6 mm; grubość ziarna 5 μ m; faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego; elucja gradientowa; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,60 ml/min; czas analizy: 60 minut). Numeracja pików na chromatogramach odpowiada zidentyfikowanym związkom, przedstawionym w tabeli 24. Ekstrakty dozowano w ilości 15 μ l.

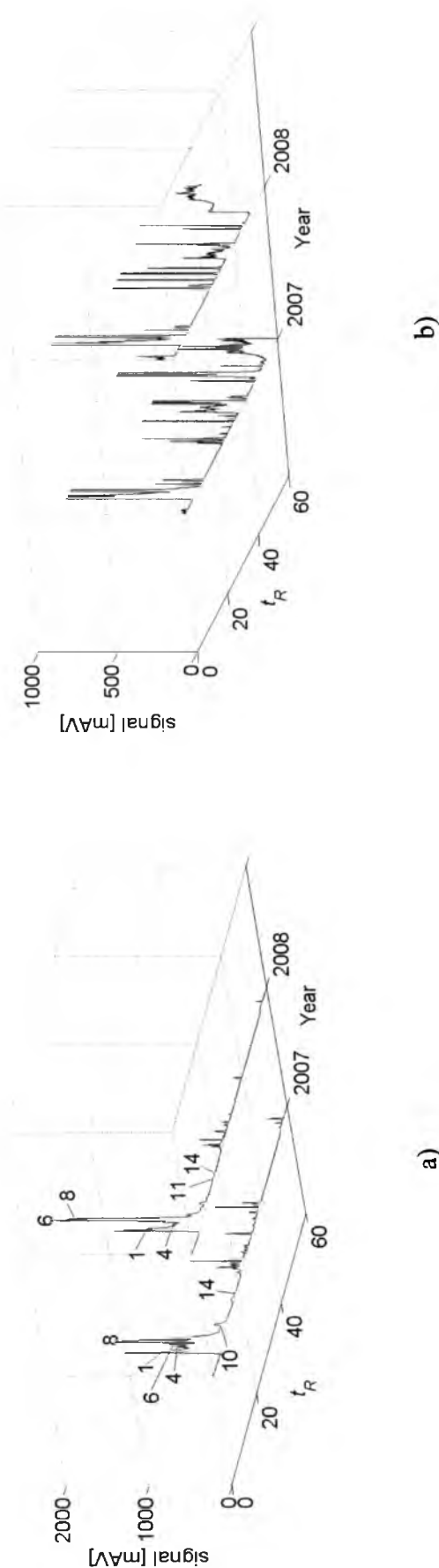


a)

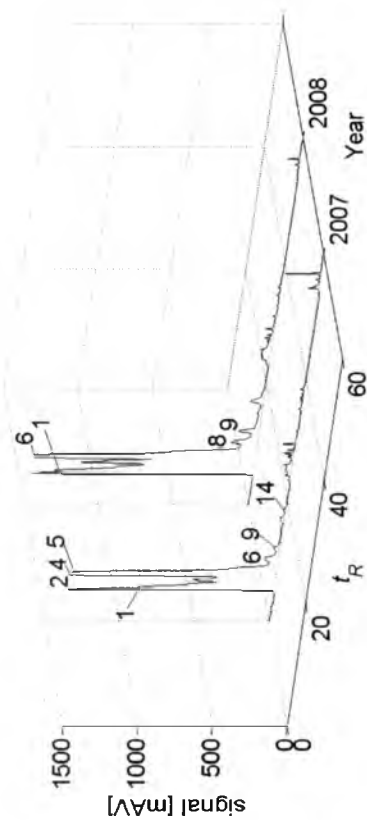


b)

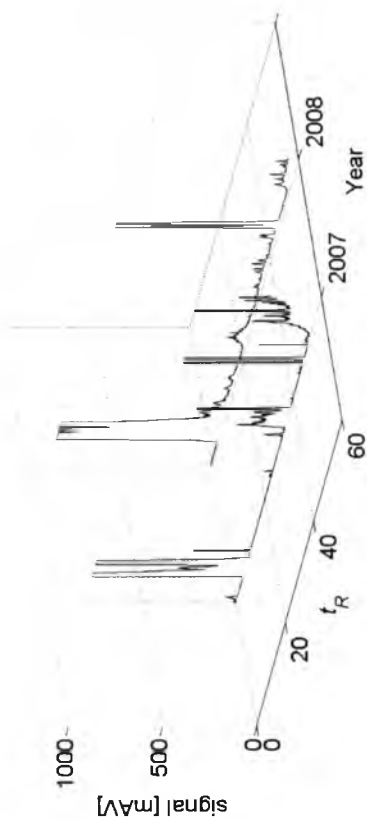
Rys. 27. Porównanie chromatogramów metanolowych ekstraktów *S. jurisicii* zebranej w 2007 i 2008 roku przy pomocy dwóch różnych metod detekcji: a) detektor fotodiodowy (DAD) i b) detektor ELSD (chromatograf cieczowy Varian 920-LC, kolumna Varian, typu Pursuit C18, wymiary 250 mm × 4,6 mm; grubość ziarna 5 μm ; faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego; elucja gradientowa; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,60 ml/min; czas analizy: 60 minut). Numeracja pików na chromatogramach odpowiada zidentyfikowanym związkom, przedstawionym w tabeli 24. Ekstrakty dozowano w ilości 15 μl .



Rys. 28. Porównanie chromatogramów metanolowych ekstraktów *S. triloba* zebranej w 2007 i 2008 roku przy pomocy dwóch różnych metod detekcji: a) detektor fotiododowy (DAD) i b) detektor ELSD (chromatograf cieczowy Varian 920-LC, kolumna Varian, typu Pursuit C18; wymiary 250 mm \times 4,6 mm; grubość ziarna 5 μ m; faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego; elucja gradientowa; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,60 ml/min; czas analizy: 60 minut). Numeracja pików na chromatogramach odpowiada zidentyfikowanym związkom, przedstawionym w tabeli 24. Ekstrakty dozowano w ilości 15 μ l.

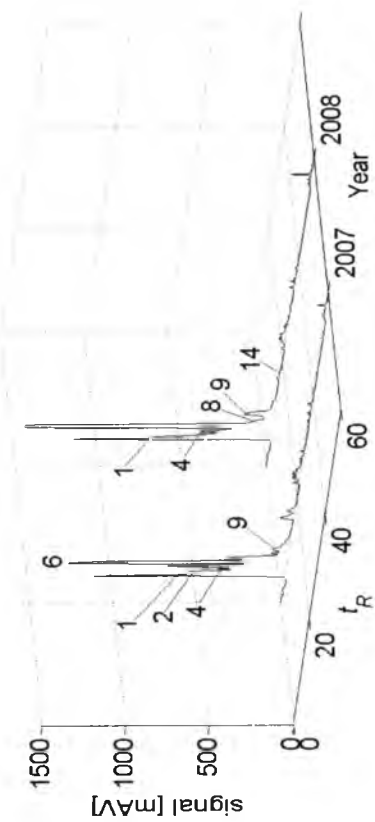


a)

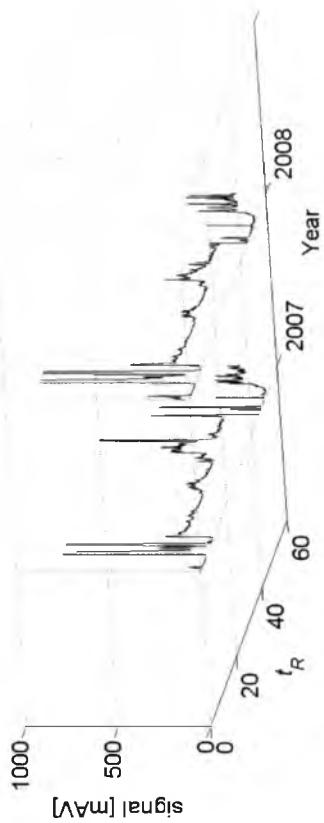


b)

Rys. 29. Porównanie chromatogramów metanolowych ekstraktów *S. azurea* zebranej w 2007 i 2008 roku przy pomocy dwóch różnych metod detekcji: a) detektor fotodiodowy (DAD) i b) detektor ELSD (chromatograf cieczowy Varian 920-LC, kolumna Varian, typu Pursuit C18, wymiary 250 mm × 4,6 mm; grubość ziarna 5 µm; faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego; elucja gradientowa; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,60 ml/min; czas analizy: 60 minut). Numeracja pików na chromatogramach odpowiada zidentyfikowanym w tabeli 24. Ekstrakty dozowano w ilości 15 µl.

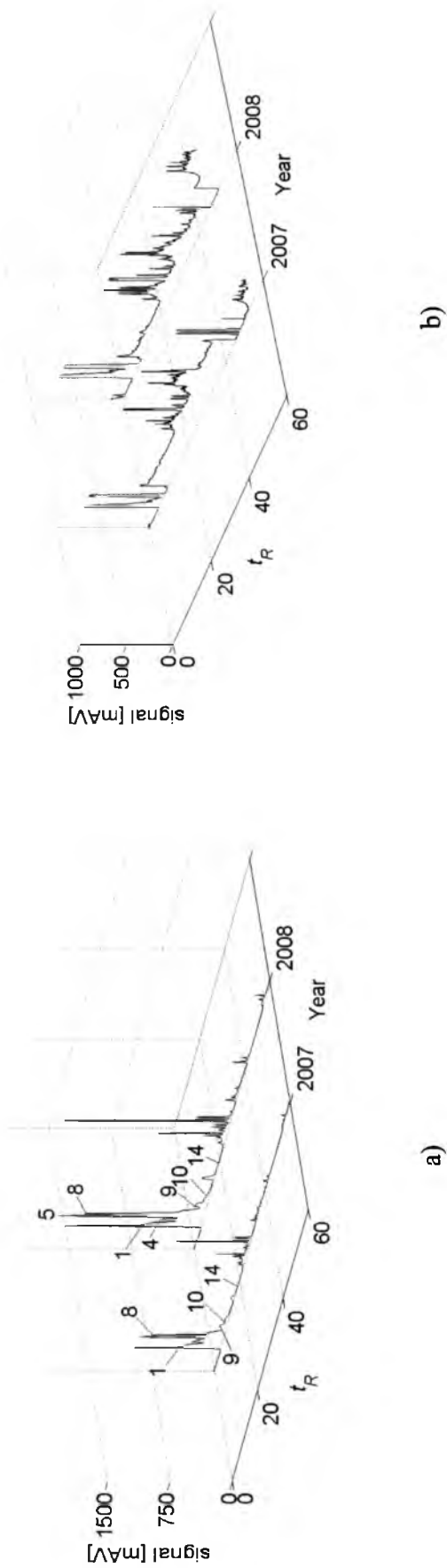


a)



b)

Rys. 30. Porównanie chromatogramów metanolowych ekstraktów *S. farskaohlei* zebranej w 2007 i 2008 roku przy pomocy dwóch różnych metod detekcji: a) detektor fotodiodowy (DAD) i b) detektor ELSD (chromatograf cieczowy Varian 920-LC, kolumna Varian, typu Pursuit C18; wymiary 250 mm × 4,6 mm; grubość ziarna 5 µm; faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego; elucja gradientowa; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,60 ml/min; czas analizy: 60 minut). Numeracja pików na chromatogramach odpowiada zidentyfikowanym związkom, przedstawionym w tabeli 24. Ekstrakty dozowano w ilości 15 µl.



Rys. 31. Porównanie chromatogramów metanolowych ekstraktów *S. nemorosa* zebranej w 2007 i 2008 roku przy pomocy dwóch różnych metod detekcji: a) detektor fotodiodowy (DAD) i b) detektor ELSD (chromatograf cieczowy Varian 920-LC, kolumna Varian, typu Pursuit C18; wymiary 250 mm \times 4,6 mm; grubość ziarna 5 μ m; faza ruchoma: metanol + woda z dodatkiem 1% (v/v) lodowatego kwasu octowego; elucja gradientowa; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,60 ml/min; czas analizy: 60 minut). Numeracja pików na chromatogramach odpowiada zidentyfikowanym związkom, przedstawionym w tabeli 24. Ekstrakty dozowano w ilości 15 μ l.

3.4. Analiza chemometryczna metanolowych ekstraktów dwudziestu badanych gatunków szalwii

Analiza porównawcza fingerprintów tak złożonych próbek, jakimi są próbki pochodzenia naturalnego może być w znacznym stopniu ułatwiona dzięki zastosowaniu różnych metod chemometrycznych, do których należy m.in. przetwarzanie danych chromatograficznych [162], ocena różnic między badanymi próbkami [163], szacowanie liczby składników w próbce [164, 165] oraz wizualizacja wielowymiarowych danych [166]. Jednak w większości przypadków przed przystąpieniem do analizy chemometrycznej dane uzyskane podczas analizy chromatograficznej należy odpowiednio przygotować. Ten krok jest bardzo ważny, ponieważ brak odpowiedniego przetworzenia danych może utrudnić lub nawet uniemożliwić odnalezienie różnic między badanymi próbkami. Tak więc właściwe przetworzenie sygnału instrumentalnego ma kluczowe znaczenie dla dalszych analiz porównawczych i badawczych. Proces ten jest trudnym zadaniem i wymaga zachowania szczególnej ostrożności, gdy wykorzystuje się kolejno kilka metod. W zależności od rodzaju próbki i zastosowanej techniki chromatograficznej uzyskane fingerprinty mogą zawierać różne informacje, dlatego ich przetworzenie powinno z jednej strony umożliwiać wyłącznie podkreślenie różnic między analizowanymi próbkami związane z ich składem chemicznym, a z drugiej strony prowadzić do zniwelowania zbędnych odchyleń oraz do zwiększenia stosunku sygnału do szumu.

W niniejszym rozdziale skupiono się na aspektach wstępnego przygotowania danych i analizie porównawczej chromatogramów cieczowych metanolowych ekstraktów dwudziestu różnych gatunków szalwii zebranych w 2007 roku (Tab. 26).

Przetworzenie sygnałów instrumentalnych opiera się na trzech celach:

1. zwiększeniu jakości sygnału;
2. umożliwieniu analizy sygnału;
3. zwiększeniu możliwości interpretacji końcowych wyników.

Cele te są zazwyczaj realizowane w kilku kolejnych etapach wstępnego przetwarzania sygnału, które opisano poniżej.

Pierwszym etapem przetwarzania sygnałów instrumentalnych było dostosowanie ich długości i/lub usunięcie pewnych ich części, które nie wnoszą istotnych informacji do interpretacji wyników.

Tab. 26. Wykaz gatunków szalwii poddanych analizie chemometrycznej

Nr	Gatunek szalwii	Nr	Gatunek szalwii
1	<i>S. azurea</i>	11	<i>S. hians</i>
2	<i>S. lavandulifolia</i>	12	<i>S. triloba</i>
3	<i>S. verticillata</i>	13	<i>S. glutinosa</i>
4	<i>S. pratensis</i>	14	<i>S. nemorosa</i>
5	<i>S. staminea</i>	15	<i>S. tesquicola</i>
6	<i>S. deserta</i>	16	<i>S. amplexicaulis</i>
7	<i>S. cadmica</i>	17	<i>S. atropatana</i>
8	<i>S. forskaohlei</i>	18	<i>S. stepposa</i>
9	<i>S. sclarea</i>	19	<i>S. jurisicii</i>
10	<i>S. canariensis</i>	20	<i>S. officinalis</i>

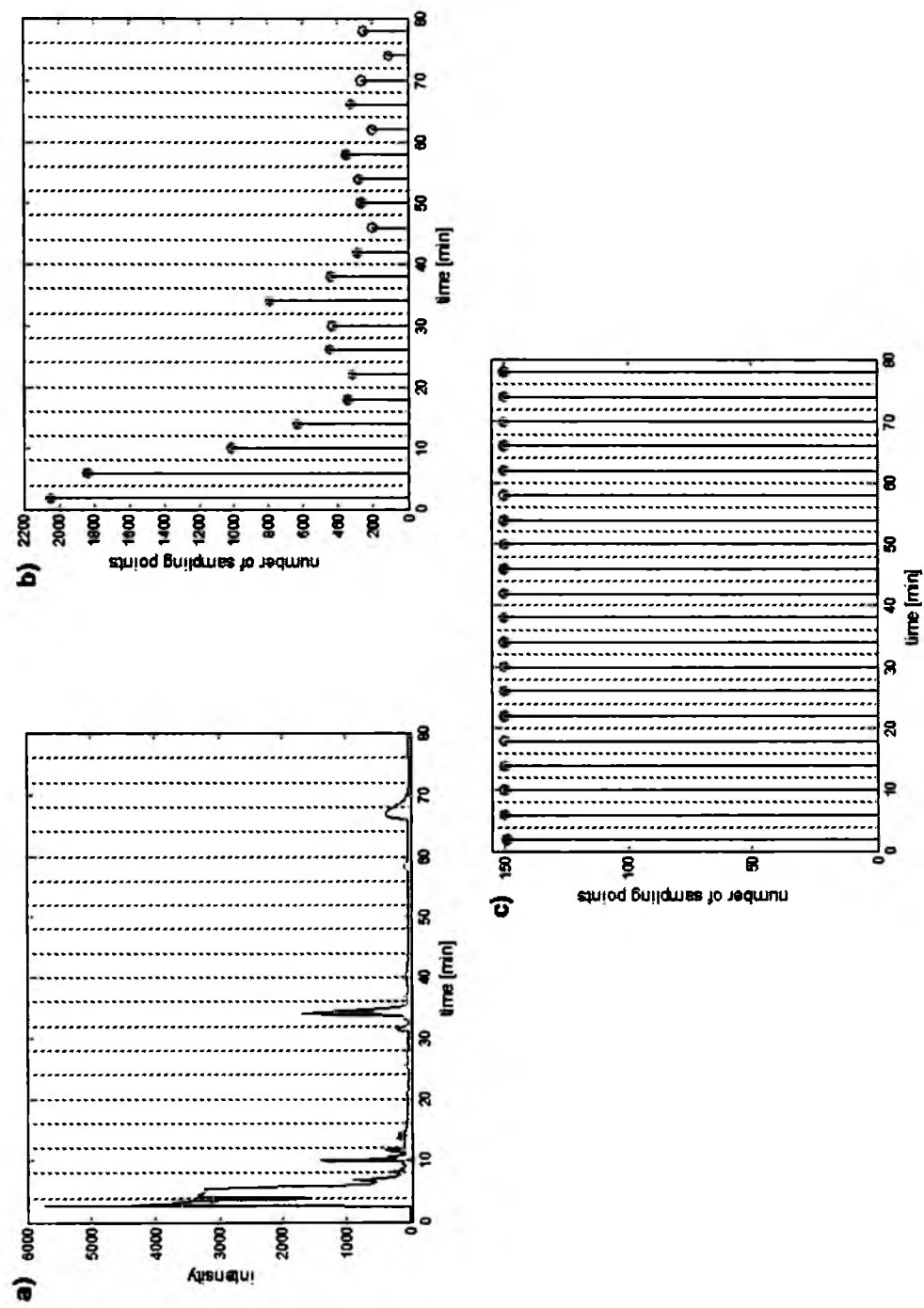
Podczas analizy chromatograficznej metanolowych ekstraktów szalwii zastosowano opcję różnej częstotliwości akwizycji dla każdej z próbek, przez

co osiągnięto lepsze kształty pików. Niemniej jednak konsekwencją takiego podejścia było uzyskanie niejednorodnej osi czasu, tzn. w każdym przedziale czasowym każda próbka różniła się ilością punktów pomiarowych. Długość analizowanych fingerprintów wahała się zatem od 4380 do 10859 punktów. Kolejnym krokiem w przetwarzaniu danych jest ich umieszczenie w macierzy, jednak żeby tego dokonać, chromatogramy powinny posiadać tę samą ilość punktów pomiarowych. Aby stworzyć macierz, należałoby wykonać powtórny analizę, lecz tym razem z zastosowaniem tej samej częstotliwości akwizycji lub, co uczyniono w tym przypadku, wyrównać długość chromatogramów. Wyrównanie długości chromatogramów osiągnięto poprzez zastosowanie liniowej interpolacji punktów z oryginalnej osi czasu na nową oś czasu, na której punkty te zostały równomiernie rozłożone w całym przedziale czasowym.

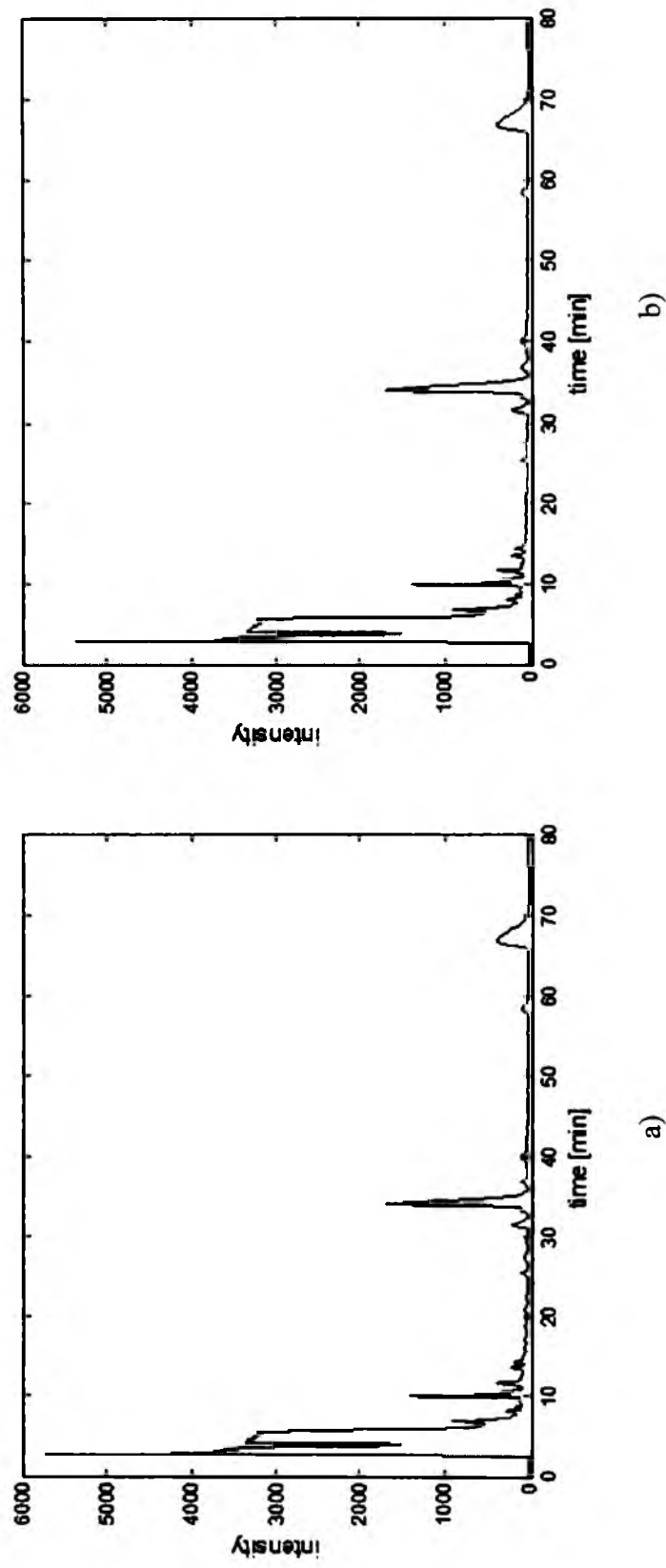
W celu zilustrowania przeprowadzonego procesu na rysunku 32a przedstawiono oryginalny chromatogram próbki 12 (*S. triloba*) podzielony na dwadzieścia stref czasowych, co cztery minuty każda. W każdej strefie czasowej określono liczbę punktów pomiarowych, co zaprezentowano na rysunku 32b. Na tym rysunku można również zaobserwować znaczne różnice w ilości punktów pomiarowych w poszczególnych strefach czasowych. Pod względem liczby punktów szerokości poszczególnych sekcji są stosunkowo duże i wynoszą od 110 do 2048 punktów pomiarowych. Jednak, jak zaprezentowano na rysunku 32c zastosowanie liniowej interpolacji umożliwiło wyrównanie ilości punktów pomiarowych w każdej sekcji czasowej. Po tej transformacji najdłuższy chromatogram (*S. triloba* (12)) został skompresowany o czynnik równy około 3,6 (tzn. z 10859 do 3000 punktów pomiarowych). Jak przedstawiono na rysunku 33b, na chromatogramie po kompresji nadal widoczne są wszystkie ważne sygnały.

Ponadto, użycie liniowej interpolacji do wyrównania długości chromatogramów pozwala na zachowanie kształtu pików. Wydaje się również, iż najlepszym rozwiązaniem było dostosowanie liczby punktów pomiarowych do nowej osi czasu, odpowiadającej najkrótszemu chromatogramowi. Bardzo często liczba punktów pomiarowych chromatogramu może zostać znacznie zmniejszona praktycznie bez utraty zawartych w nich informacji, co tym samym przyczynia się do zmniejszenia mocy obliczeniowej niezbędnej do przetworzenia sygnałów. W tym miejscu należy jednak podkreślić, iż w przypadku gdy chromatogramy wymagają odszumienia, do dostosowania ich długości nie należy używać liniowej interpolacji, ponieważ operacja ta wpływa na charakterystykę szumu. Jednak w przypadku analizowanego zestawu chromatogramów cieczowych eliminacja szumu okazała się niepotrzebna z uwagi na zadawalający poziom stosunku sygnału do szumu. Opisane powyżej przygotowanie sygnału jest często stosowane przed dopasowaniem i nakładaniem sygnałów instrumentalnych.

Zatem, jak łatwo się domyśleć, i w tym przypadku kolejnym etapem było dopasowanie i nakładanie chromatogramów przy pomocy algorytmu COW [102]. Początkowo dla analizowanych fingerprintów wybrano sygnał wzorcowy na podstawie kryterium, jakim był współczynnik korelacji. Mianowicie, spośród wszystkich sygnałów, jako sygnał wzorcowy wybrano ten o najwyższej średniej współczynnika korelacji, do którego następnie dopasowano pozostałe sygnały [167]. Optymalne wyniki dla wszystkich chromatogramów osiągnięto poprzez podział sygnałów na 120 sekcji, których liczba „stopni swobody” (ang. slack parameters) wynosiła 5. Chromatogramy cieczowe uzyskane dla ekstraktów gatunków *S. azurea* i *S. sclarea* przedstawione na rysunku 34a ilustrują trudności, jakie występują podczas nakładania chromatogramów.



Rys. 32. a) Chromatogram cieczonego ekstraktu gatunku *S. triloba* (12) podzielony na dwadzieścia sekcji czasowych, co 4 minuty każda; b) liczba punktów pomiarowych w każdym oknie czasowym po liniowej interpolacji sygnału do długości 3000 punktów pomiarowych.



Rys. 33. Chromatogram cieczowy uzyskany dla ekstraktu *S. triloba* (12) a) przed i b) po zastosowaniu liniowej interpolacji, która spowodowała zmniejszenie liczby punktów pomiarowych z 10859 do 3000.

Mimo, iż zazwyczaj próbki pochodzenia naturalnego różnią się składem chemicznym, to z rysunku 34b jednoznacznie wynika, że zastosowanie metody COW do nakładania chromatogramów pozwala na osiągnięcie zadowalających rezultatów.

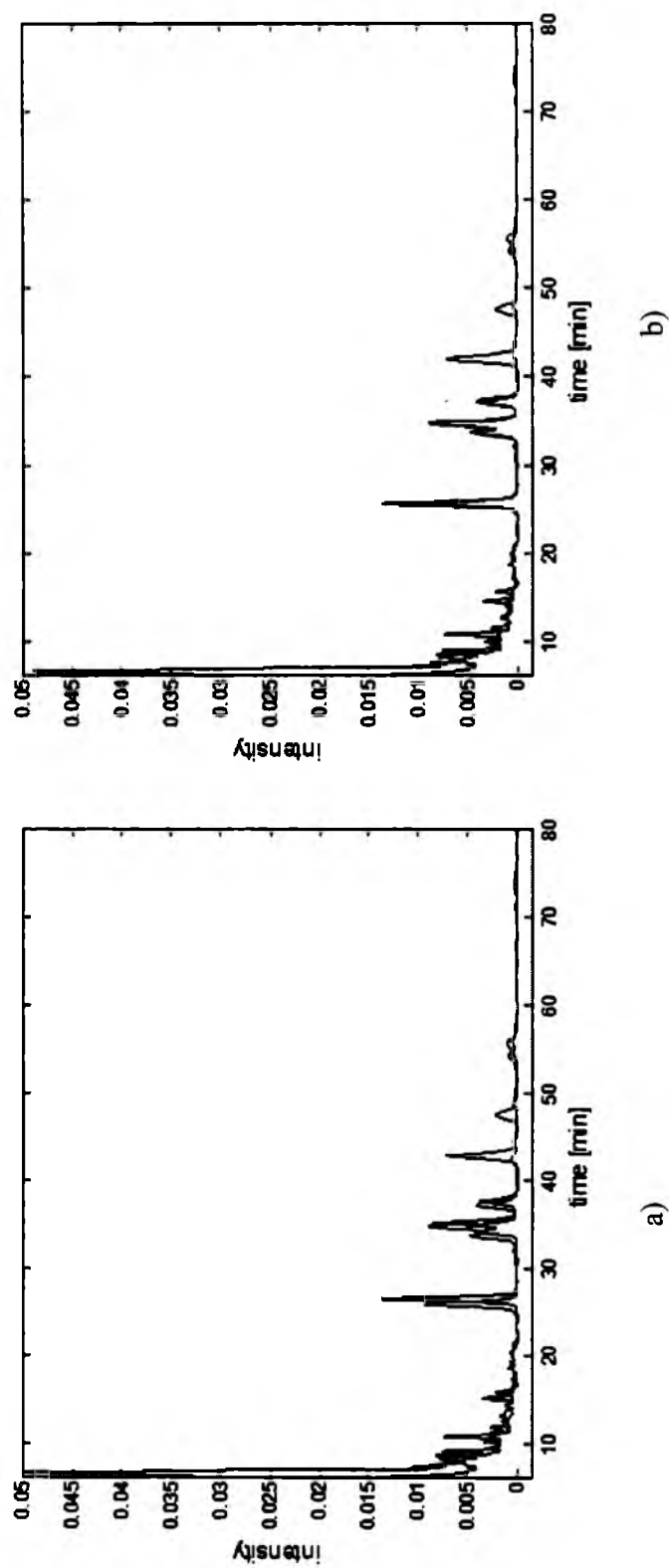
Ostatnim etapem przygotowania chromatogramów była dodatkowa transformacja. Dla analizowanych fingerprintów można zastosować różne rodzaje normalizacji, jednak prawdopodobnie najczęściej stosowaną transformacją jest prosta normalizacja poszczególnych sygnałów, mająca na celu usunięcie błędów związanych z dozowaniem próbki. Oprócz zastosowanej w tym przypadku normalizacji istnieją także inne jej warianty, jak np. skalowanie profili stężeniowych sygnału do największego pików (jest to tzw. skalowanie *Pareto*) [168, 169]. Ponadto, przed przystąpieniem do analizy porównawczej, w celu dodatkowego podkreślenia różnic między normalizowanymi fingerprintami, dane poddano centrowaniu. Kompleksowy przegląd oraz omówienie różnych metod przygotowania sygnałów instrumentalnych można znaleźć w literaturze [168, 170].

Po wstępnym przygotowaniu fingerprintów (czyli po wyrównaniu ich długości, dopasowaniu oraz normalizacji) możliwym staje się znalezienie i porównanie różnic między badanymi próbkami. Jeżeli etapy związane z przygotowaniem chromatogramów zostały przeprowadzone z należytą ostrożnością i dokładnością, to niepożądana część danych została z nich usunięta, a analiza porównawcza będzie się opierać wyłącznie na istotnych informacjach dotyczących zróżnicowania składu chemicznego badanych próbek

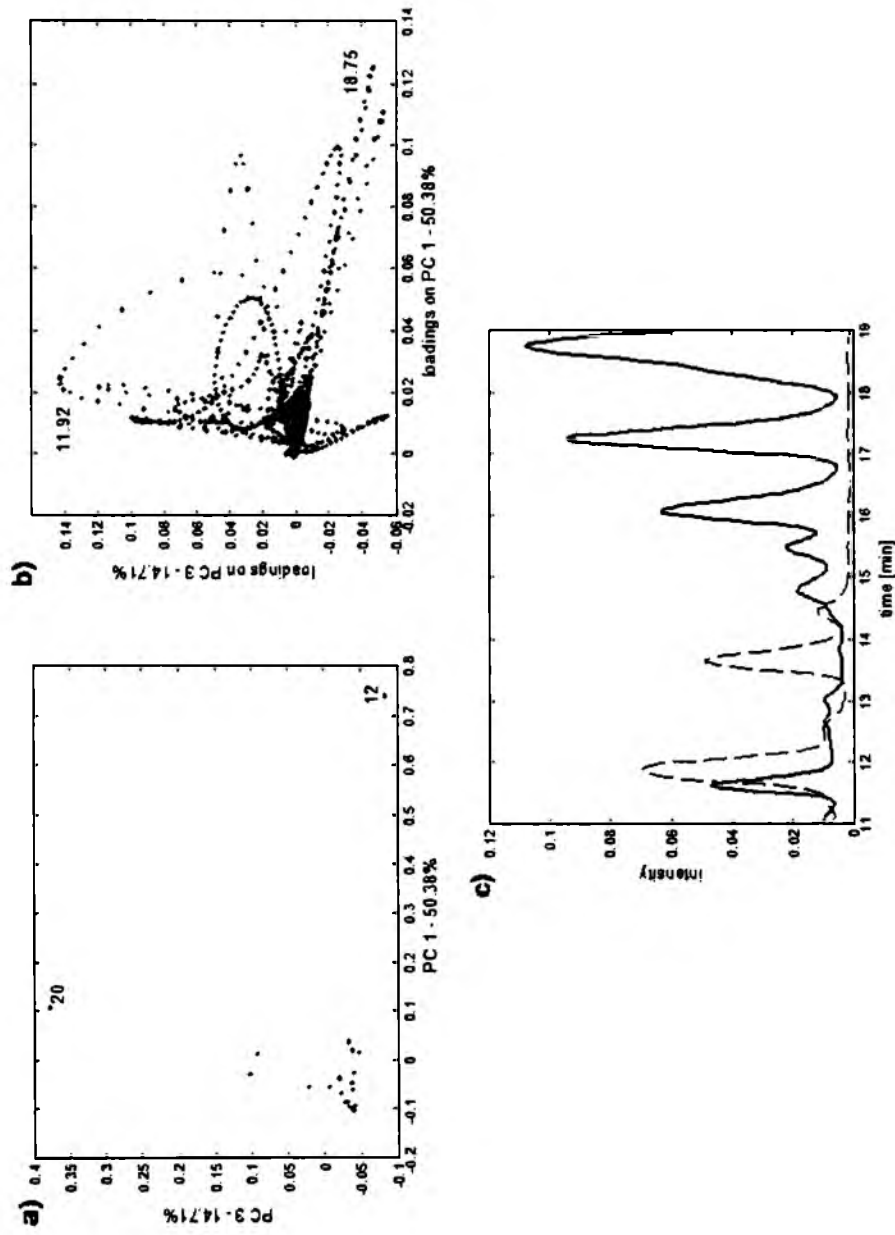
Chemometria dysponuje wieloma metodami eksploracji danych. W niniejszej pracy wykorzystano jedną z nich, a mianowicie analizę czynników głównych (PCA) w celu znalezienia zarówno podobieństw, jak i różnic w badanych gatunkach szafwii.

Dla chromatogramów cieczowych kompresja danych przy użyciu PCA okazała się dość skuteczna, gdyż pierwsze dwa czynniki główne opisały ponad 72% całkowitej wariancji danych. Najbardziej interesujący rozkład próbek uzyskano podczas projekcji wyników dla pierwszego i trzeciego czynnika głównego, co zaprezentowano na rysunku 35a. Na tej projekcji wyników widoczne są dwie próbki o unikalnych właściwościach, które są znacznie oddalone od pozostałych próbek. Są to ekstrakty *S. glutinosa* (próbka 12 widoczna przy największej wartości pierwszego czynnika głównego PC1) oraz ekstrakt *S. officinalis* (próbka 20 widoczna przy największej wartości trzeciego czynnika głównego PC3). Unikalność próbki *S. glutinosa* można wyjaśnić obecnością intensywnego pików przy czasie retencji (t_R) wynoszącym 18,75 min., natomiast dla próbki *S. officinalis* jest to obecność pików o stosunkowo dużej intensywności przy czasie retencji wynoszącym 11,92 min. (Rys. 33b). Oprócz tego na rysunku 35c przedstawiono fragmenty dwóch nałożonych na siebie chromatogramów *S. glutinosa* i *S. officinalis* ilustrujące wyraźne różnice w składzie chemicznym ekstraktów tych dwóch gatunków szafwii.

Podsumowując, wstępne przygotowanie chromatograficznych fingerprintów jest bardzo ważnym etapem, który można uznać za niezbędny i obowiązkowy przed rozpoczęciem właściwej analizy porównawczej przy użyciu metod chemometrycznych. Chcąc zastosować kilka metod do wstępnego przetwarzania sygnałów instrumentalnych należy zwrócić szczególną uwagę podczas wyboru ich kolejności. Wiele różnych metod chemometrycznych może posłużyć do eksploracji danych, jednak najwięcej uwagi przyciąga analiza czynników głównych (PCA), ponieważ umożliwia ona wskazanie różnic między próbkami i uzyskanie informacji na temat wkładu oryginalnych zmiennych do całkowitej wariancji danych. W przypadku sygnałów chromatograficznych można również wskazać kilka istotnych obszarów na chromatogramie, które są charakterystyczne i zawierają ważne informacje dla wyjaśnienia struktury danych. Tak więc, potencjalnie można zebrać interesującą frakcję i przeprowadzić dodatkowe analizy, które pomogą w identyfikacji związków obecnych w tej frakcji.



Rys. 34. Dwa nałożone chromatogramy próbek 1 (*S. azurea*) i 9 (*S. sclarea*) a) przed i b) po ich dopasowaniu przy użyciu algorytmu COW.



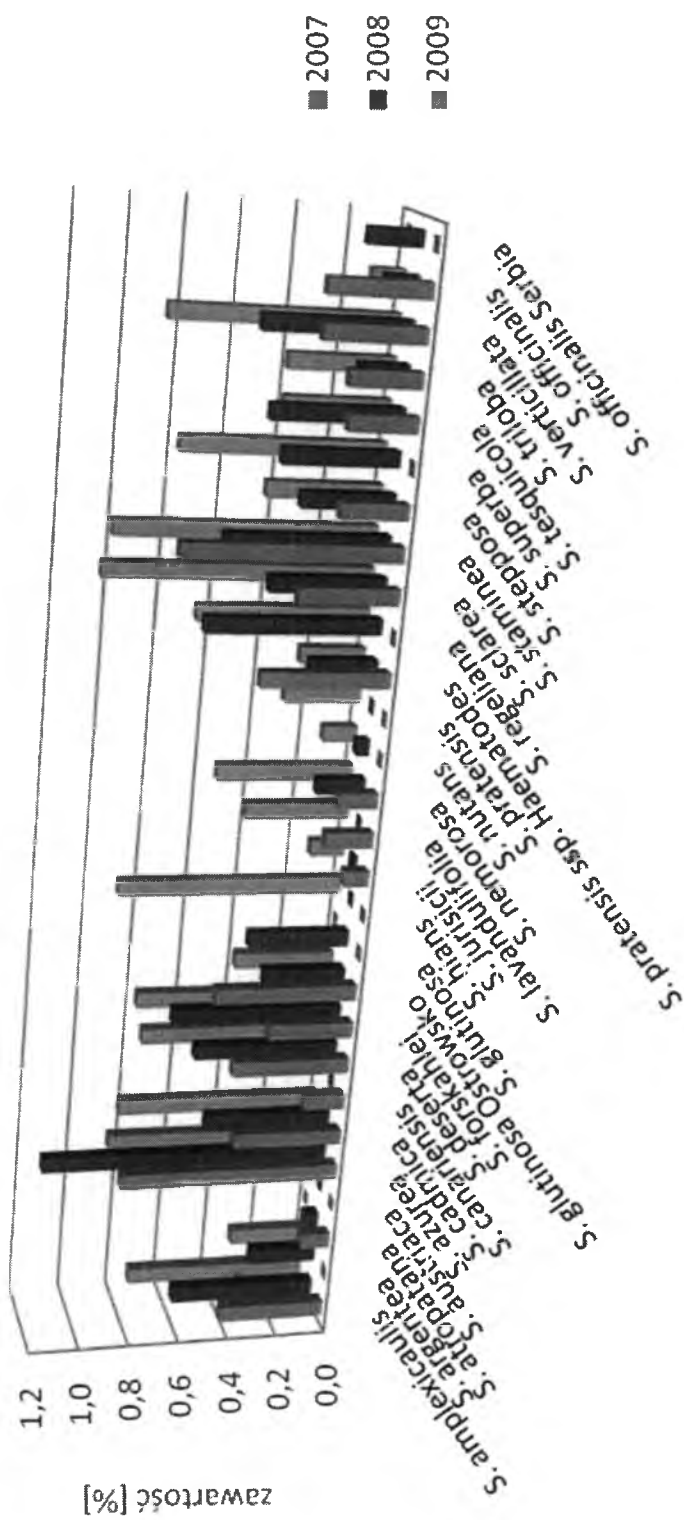
Rys. 35. a) Projektcja dwudziestu gatunków szalwii na płaszczyznę zdefiniowaną przez pierwszy i trzeci czynnik główny PC1 – PC3, b) projekcja wag pierwszego i trzeciego czynnika głównego, oraz c) dwa nałożone na siebie chromatogramy próbek 13 (*S. glutinosa* – linia przerywana) i 20 (*S. nemorosa* – linia ciągła), dla których przy pomocy PCA opisano różnice w składzie chemicznym.

4. Analiza frakcji związków fenolowych wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji

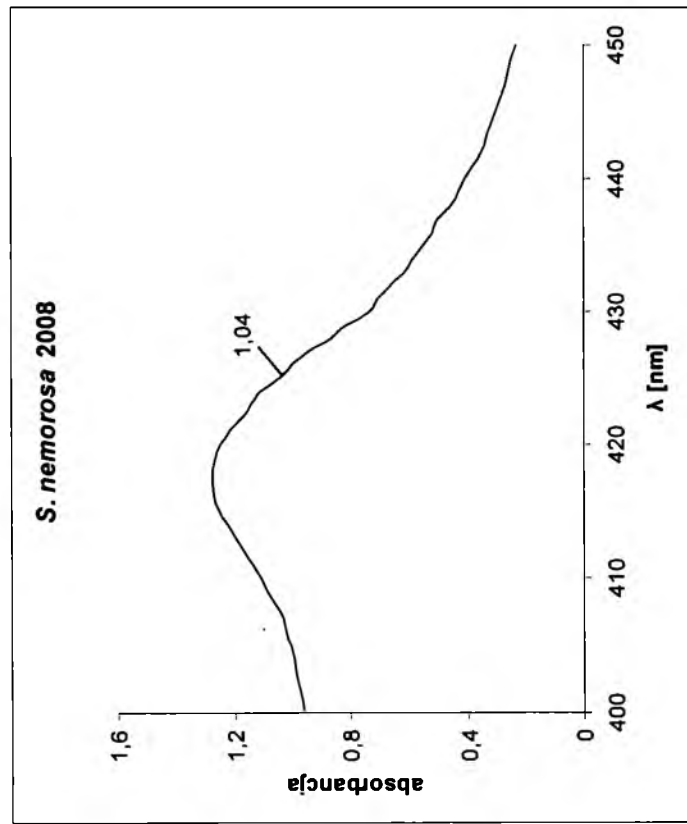
4.1. Analiza spektrofotometryczna kwasów fenolowych i flawonoidów wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji

W pierwszym etapie badań dwadzieścia sześć gatunków szalwii zebranych w latach od 2007 do 2009 poddano selektywnej ekstrakcji, obejmującej dwie odrębne procedury izolacji kwasów fenolowych i flawonoidów [54]. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę spektrofotometryczną otrzymanych ekstraktów szalwii, która również opierała się na dwóch osobnych procedurach oznaczania, a która umożliwiła obliczenie procentowej sumarycznej zawartości dwóch wspomnianych wyżej grup związków [54]. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono graficznie na rysunkach 36 i 37. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w przypadku większości gatunków zebranych we wszystkich trzech sezonach (tj. *S. amplexicaulis*, *S. cadmica*, *S. deserta*, *S. forskahlei*, *S. nemorosa*, *S. sclarea*, *S. stepposa* i *S. verticillata*) zaobserwowano pewną tendencję, która przedstawia się następująco: najwyższą zawartość kwasów fenolowych dla tych gatunków odnotowano w 2009 roku, mniejszą w 2008 roku, a najmniejszą w 2007 roku. W przypadku gatunków zebranych w dwóch sezonach prawidłowość ta również jest widoczna, tzn. wyższą zawartość kwasów fenolowych odnotowano dla gatunków zebranych w późniejszym sezonie wegetacyjnym, natomiast niższą dla tych zebranych we wcześniejszym sezonie wegetacyjnym. Z kolei dla próbek zawierających flawonoidy nie zaobserwowano podobnych tendencji, ani jednoznacznych prawidłowości. Uzyskane wyniki pozwalają jedynie stwierdzić, że w przypadku gatunków zebranych we wszystkich trzech sezonach najwyższą zawartość flawonoidów wykazują albo gatunki zebrane w 2007 roku, albo w 2009 roku, ale nigdy te zebrane w 2008 roku. Wpływ na uzyskane wyniki mają liczne czynniki, m. in. takie, jak nasłonecznienie, opady czy czas zbioru roślin, jednak wydaje się, iż w tym przypadku największą rolę odgrywa czas przechowywania badanych ziół. Jest to szczególnie widoczne w przypadku próbek zawierających kwasy fenolowe, dla których prawdopodobieństwo to właśnie długi czas przechowywania badanych gatunków szalwii negatywnie wpływa na zawartość tej grupy związków. Mając na uwadze wyniki przeprowadzonych badań postanowiono, iż do dalszych analiz będą wybierane gatunki zebrane w 2009 roku. Należy jednak podkreślić, że na podstawie przeprowadzonych eksperymentów okazało się, że procedura spektrofotometrycznego oznaczania zarówno kwasów fenolowych, jak i flawonoidów nie jest doskonała, gdyż obie grupy związków występują w materiale roślinnym nie tylko jako wolne substancje, ale także w różnych formach związanych. Na rysunkach 38 i 39 przedstawiono wartości absorbancji mierzone dla wybranych gatunków szalwii.

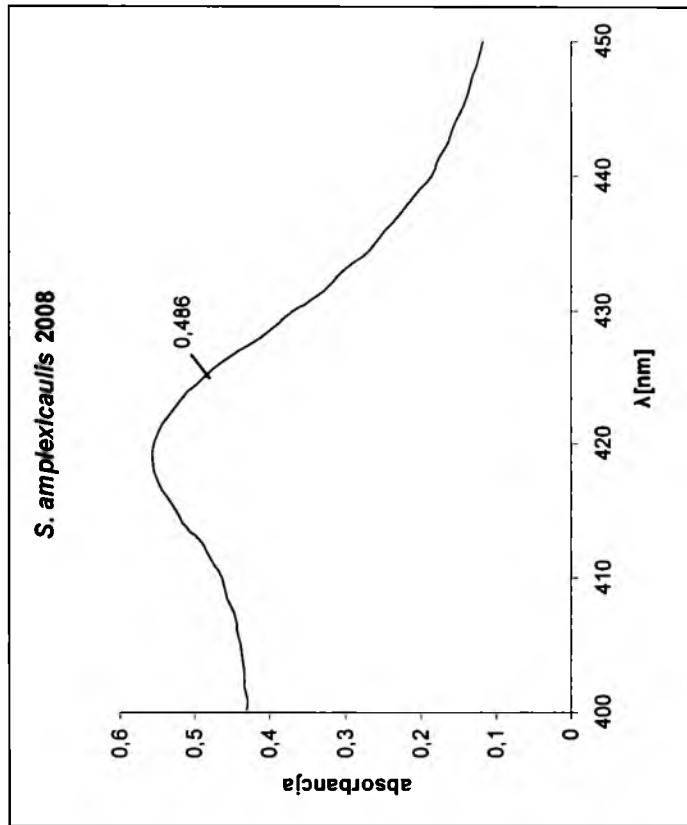
Sumaryczna zawartość kwasów fenolowych



Rys. 36. Sezonowe porównanie procentowej zawartości kwasów fenolowych w przeliczeniu na suchą masę materiału roślinnego w dwudziestu sześciu badanych gatunkach szalwii w oparciu o wyniki uzyskane techniką spektrofotometryczną.

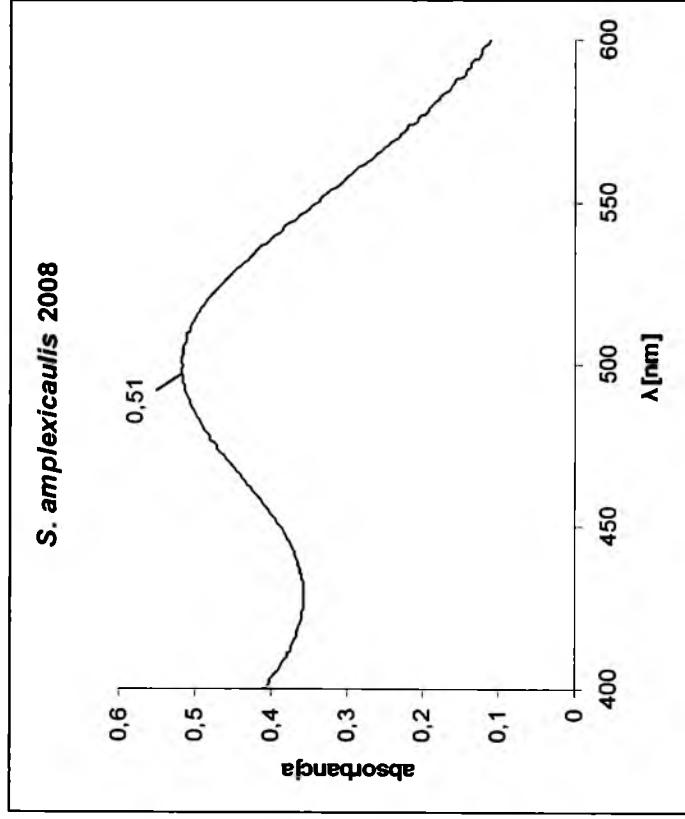


a)

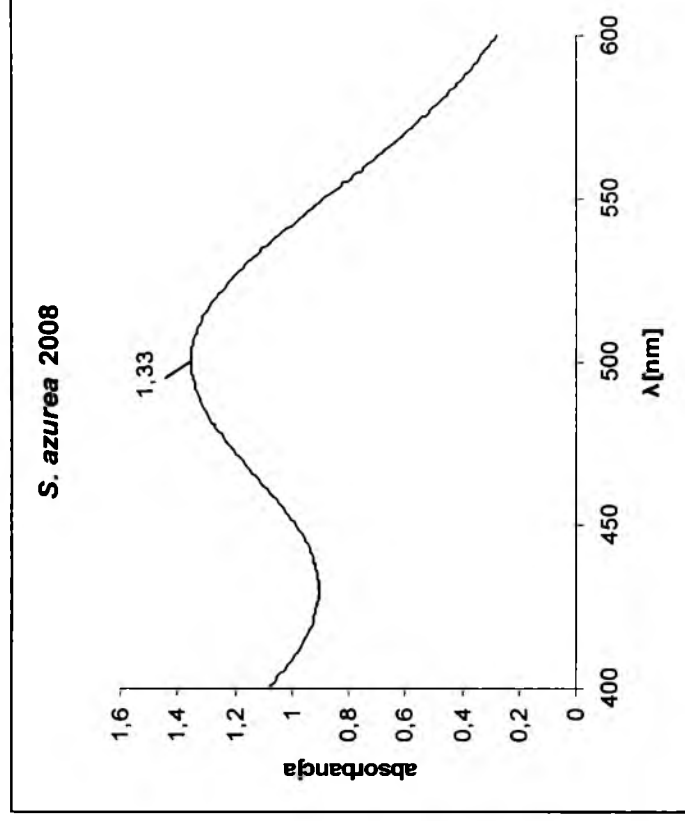


b)

Rys. 38. Widma absorpcyjne UV-Vis ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji flawonoidów dla gatunków a) *S. nemorosa* oraz b) *S. amplexicaulis* zebranych w 2008 roku. Na rysunku pokazano, jak różnią się wartości absorbancji dla przykładowych ekstraktów dwóch różnych gatunków szalwii, mierzone przy farmakopealnej zalecanej długości fali świetlnej, $\lambda = 425$ nm.



a)



b)

Rys. 39. Widma absorpcyjne UV-Vis ekstraktów uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji kwasów fenolowych dla gatunków a) *S. amplexicaulis* oraz b) *S. azurea* zebranych w 2008 roku. Na rysunku pokazano, jak różnią się wartości absorbancji dla przykładowych ekstraktów dwóch różnych gatunków szatwii, mierzone przy farmakopealnej zalecanej długości fali świetlnej, $\lambda = 490$ nm.

4.2. Analiza frakcji związków fenolowych wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas

Dotychczas, chcąc przeprowadzić analizę substancji zawartych w mieszaninach z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas, należało dokonać ich wstępnej lub całkowitej separacji. W tym celu, biorąc pod uwagę techniki chromatograficzne, stosowano preparatywną chromatografię planarną (PLC) lub chromatografię kolumnową (LSC). Jednak techniki te wymagają czasochłonnnych czynności, które w przypadku PLC są związane m.in. z zeszkrobieniem z płytki rozdzielonych pasm, a następnie z wymywaniem substancji z powierzchni adsorbenta lub, jak w przypadku LSC, z niejednokrotnie długim czasem prowadzenia rozdziału oraz koniecznością stosowania dużych ilości rozpuszczalników.

Stosunkowo niedawno pojawiła się możliwość sprzężenia chromatografii cienkowarstwowej ze spektrometrem mas. Połączenie obu tych technik analitycznych stało się możliwe za sprawą wprowadzenia na rynek interfejsu TLC-MS (Rys. 40). Sprzęt ten może zostać z łatwością podłączony do dowolnego chromatografu cieczowego sprzężonego z spektrometrem masowym bez konieczności wprowadzania do jego systemu jakichkolwiek zmian. Analiza polega na półautomatycznym wymywaniu rozdzielonych pasm z płytki chromatograficznej i kierowaniu ich bezpośrednio lub pośrednio poprzez kolumnę chromatograficzną do spektrometru masowego.



Rys. 40. Interfejs TLC-MS [171].

W ten sposób chromatografia cienkowarstwowa zyskała nowy wymiar analityczny, który zwiększył jej możliwości oraz sprawił, iż technika ta stała się jeszcze bardziej elastycznym i lepiej funkcjonującym narzędziem służącym zarówno do rozdziału, jak i do identyfikacji różnego rodzaju związków chemicznych. W większości przypadków pełny rozdział chromatograficzny składników mieszaniny o niezbyt skomplikowanym składzie chemicznym jest możliwy do uzyskania dzięki zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej. Następnie wykorzystując interfejs TLC-MS możliwa jest rejestracja widm masowych należących odpowiednio do pojedynczych składników takiej mieszaniny. Jednak dla próbek o złożonym składzie chemicznym rozdział na pojedyncze substancje jest często niemożliwy do osiągnięcia.

Mamy wówczas do czynienia z tzw. rozdziałem grupowym, w związku z czym dalsza analiza techniką spektrometrii mas umożliwia jedynie rejestrację widm masowych jako charakterystycznych fingerprintów dla każdej z rozdzielonych grup substancji. Jest to szczególnie istotne w analizie tak złożonych próbek, jak ekstrakty pochodzenia roślinnego, gdyż wykorzystując odpowiednie metody chemometryczne do analizy fingerprintów możemy odnaleźć zarówno szereg podobieństw, jak i różnic między badanymi gatunkami roślin.

W pracach Morlock i in. (np. [172, 173, 174, 175, 176, 177]) wykazano praktyczne zastosowanie interfejsu TLC-MS w celu identyfikacji substancji zawartych w mniej skomplikowanych mieszaninach na podstawie ich jonów molekularnych, natomiast w pracy [178] po raz pierwszy wykorzystano jednowymiarową technikę niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrią mas (1D LT TLC-MS) do analizy złożonych próbek, tzn. lotnych frakcji wyodrębnionych z kilku wybranych gatunków szalwii. Z kolei w pracy [179], do konstrukcji charakterystycznych fingerprintów olejku eterycznego wyodrębnionego z gatunku *Salvia lavandulifolia* został wykorzystany analityczny wariant dwuwymiarowy. To nowatorskie podejście polegało na połączeniu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (w normalnym układzie faz, z zastosowaniem żelu krzemionkowego) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem fazy stacjonarnej typu C₁₈) z techniką spektrometrii masowej (2D LT TLC-LC-MS). W pracy tej dokonano porównania wyników analiz otrzymanych w wariancie jedno- i dwuwymiarowym oraz wskazano istotne zalety analizy w wariancie dwuwymiarowym. Wykazano, że mimo, iż tryb dwuwymiarowy nie zapewnił pełnej separacji tak złożonej mieszaniny, jaką jest roślinny olejek eteryczny, to analiza ta zapewnia pełniejszą charakterystykę próbki od tej przeprowadzonej w wariancie jednowymiarowym.

W niniejszym rozdziale przedstawiono analogiczne podejście do analizy ekstraktów zawierających nietolne substancje pochodzenia roślinnego, tj. frakcji kwasów fenolowych i flawonoidów selektywnie pozyskanych z gatunku *Salvia lavandulifolia*. Rozdział związków fenolowych przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Celem pracy było podobnie, jak we wcześniej wzmiankowanej pracy [167], porównanie wyników analizy przeprowadzonej w wariancie jedno- i dwuwymiarowym. Powodem przeprowadzenia oddzielnych eksperymentów są różnice w charakterze chemicznym związków fenolowych i olejków eterycznych. Jako, że związki fenolowe wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, a nawet przeciwnowotworowe, konieczne jest sprawdzenie, czy analiza w trybie jedno- i dwuwymiarowym może być zastosowana do tych ważnych farmakologicznie metabolitów wtórnych pochodzenia roślinnego [180]. Pozytywne wyniki przeprowadzonych analiz mogą okazać się szczególnie pomocne m.in. w identyfikacji i kontroli jakości handlowych partii roślin leczniczych. W obrocie handlowym zioła występują przede wszystkim w sproszkowanej formie, co utrudnia określenie ich budowy morfologicznej, przez co ustalenie bądź też potwierdzenie gatunku nieznanego materiału roślinnego staje się prawie niemożliwe.

4.2.1. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (1D TLC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym

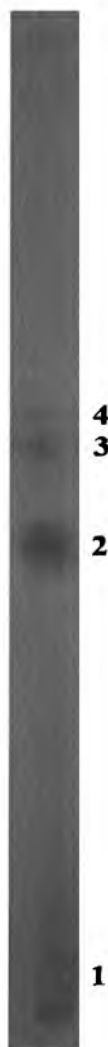
Pierwszym krokiem w przeprowadzonym eksperymencie był rozdział składników ekstraktu wyodrębnionego z gatunku *Salvia lavandulifolia* techniką chromatografii cienkowarstwowej oraz rejestracja fotograficzna otrzymanych chromatogramów (Rys. 41). Następnie każde z czterech rozdzielonych pasm wyeluowano mieszaniną metanolu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 99,5 : 0,5, stosując w tym celu interfejs TLC-MS. W ten sposób dla każdego pasma otrzymano widmo masowe, które zaprezentowano na rysunkach 42a – d.

Przed przystąpieniem do szczegółowego omówienia uzyskanych wyników wstępnie w formie syntetycznej w oparciu o literaturę [115] zostaną przekazane dotychczasowe ustalenia na temat składu chemicznego frakcji kwasów fenolowych zawartych w różnych gatunkach szalwii. Mianowicie stwierdzono, że trimery kwasu kawowego stanowią największą grupę metabolitów wtórnych zawartych w roślinach z rodzaju *Salvia*. Należą do nich takie związki, jak kwas litospermowy o masie cząsteczkowej 538 g/mol, sagekumaryna o masie cząsteczkowej 536 g/mol, kwasy salwianolowe H, I, J i K o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio 531, 531, 526 oraz 555 g/mol, a także kwasy junanowe C, D, E i F, o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio 538, 540, 572 oraz 597 g/mol. Na podstawie przeglądowego artykułu [115] w tabeli 27, wymieniono kwasy fenolowe charakterystyczne dla roślin z rodzaju *Salvia*.

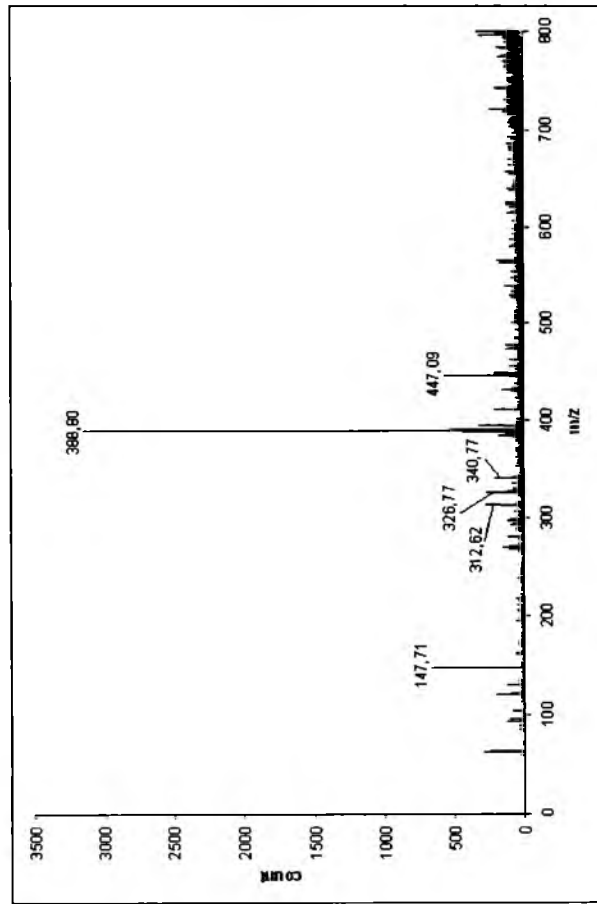
W widmach masowych zarejestrowanych dla poszczególnych pasm chromatograficznych wyeluowanych przy użyciu interfejsu TLC-MS i skierowanych bezpośrednio do spektrometru masowego, zaobserwowano kilka sygnałów o wartościach m/z odpowiadających masom cząsteczkowym niektórych kwasów fenolowych. Na przykład na widmie masowym uzyskanym dla pasma 1 (Rys. 42a) można zaobserwować intensywny sygnał o wartości m/z 388,80 (jego prawdopodobne pochodzenie zostanie omówione w dalszej części niniejszego rozdziału) oraz sygnał o znacząco mniejszej intensywności, którego wartość m/z jest równa 147,70, a który może pochodzić od jonu kwasu cynamonowego $[M-H]$. Jednak ten sam sygnał może również pojawić się w przypadku fragmentacji niektórych kwasów fenolowych (np. kwasu ferulowego, kawowego, i/lub kumarowego), które w rzeczywistości są pochodnymi kwasu cynamonowego. Następnie widoczny na widmie masowym otrzymanym dla pasma 2 (Rys. 42b) intensywny sygnał, którego wartość m/z wynosi 360,56 może pochodzić od dimeru kwasu kawowego (kwas kawowy jest podstawowym budulcem dużej ilości kwasów fenolowych pochodzenia botanicznego, a jego dimeryzacja może następować również w warunkach ESI-MS), lub od jonu molekularnego kwasu rozmarynowego. Z kolei na rysunkach 39 c i d przedstawiono widma masowe uzyskane dla pasm 3 i 4, na których widoczne są sygnały o wartościach m/z równych 163,51 (Rys. 42c) oraz 194,05 (Rys. 42d). Sygnały te mogą pochodzić odpowiednio od kwasu kumarowego i kwasu ferulowego. W tym miejscu należy jednak podkreślić, że z wyjątkiem kwasu rozmarynowego takie kwasy fenolowe, jak kwas chlorogenowy, ferulowy, *o*-kumarowy, *p*-kumarowy, kawowy, protokatechowy i galusowy nie zostały nigdy wcześniej zidentyfikowane w gatunku *Salvia lavandulifolia* [115, 181]. Chcąc ostatecznie odpowiedzieć na pytanie, czy obecna interpretacja zarejestrowanych widm masowych jest prawidłowa i czy wspomniane kwasy fenolowe naprawdę znajdują się w ekstraktach szalwii *Salvia lavandulifolia*,

należałoby przeprowadzić dodatkowe badania z wykorzystaniem substancji wzorcowych. Nie jest to jednak celem niniejszych badań. Przedstawione widma masowe zarejestrowano m.in. w celu ich wzajemnego porównania, gdyż również jako charakterystyczne fingerprinty stanowią źródło istotnych informacji.

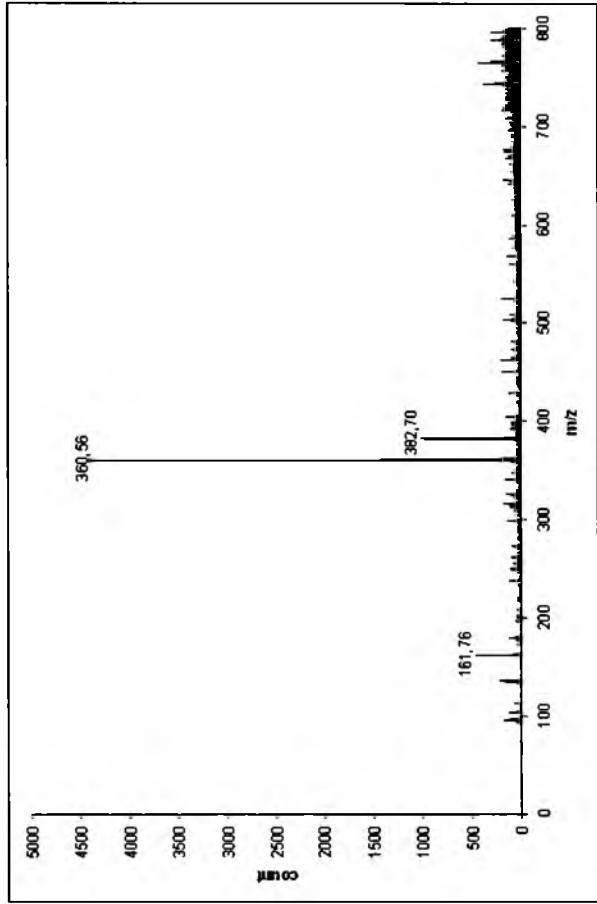
Na podstawie porównania przedstawionych wyników można stwierdzić, że na każdym z uzyskanych widm masowych sygnały o największej intensywności znacznie różnią się wartościami m/z , co świadczy o różnicach w składzie chemicznym rozdzielonych grup substancji. Wydaje się to oczywiste, ponieważ każde rozdzielone pasmo chromatograficzne posiada inną wartość współczynnika opóźnienia (R_F), a zatem wykazuje różne powinowactwo do adsorbenta, co mówiąc prościej wskazuje, że są to różne substancje, czy też grupy substancji chemicznych. Eksperyment ten w pierwszym rzędzie przeprowadzono w celu sprawdzenia przydatności interfejsu TLC-MS do analizy złożonych próbek pochodzenia roślinnego.



Rys. 41. Zdjęcie chromatogramu ekstraktu rośliny z gatunku *Salvia lavandulifolia* zawierającego kwasy fenolowe. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: octan etylu + toluen + kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 7 : 3 : 1. Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja fotograficzna chromatogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 254 \text{ nm}$. Ekstrakt naniesiono w ilości 25 μl .

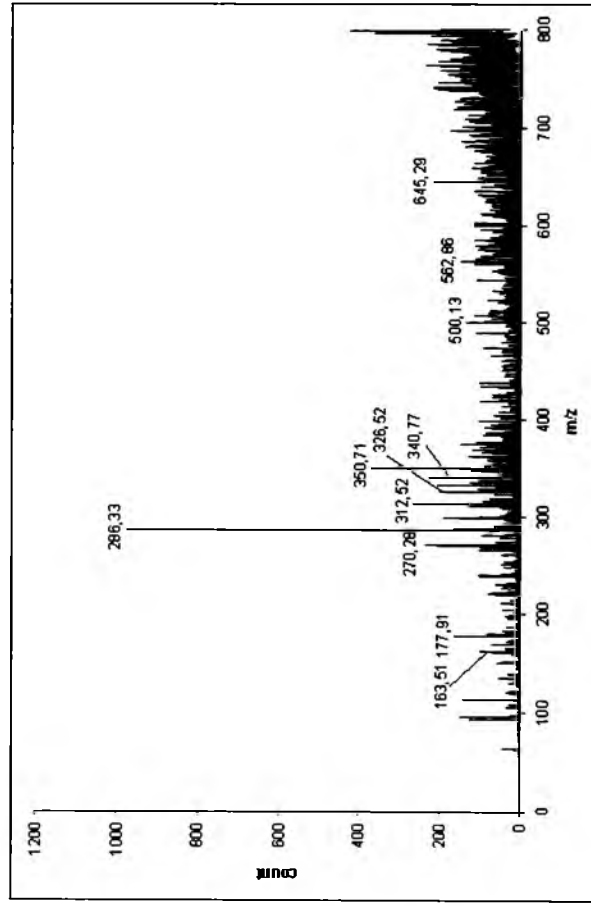


a)

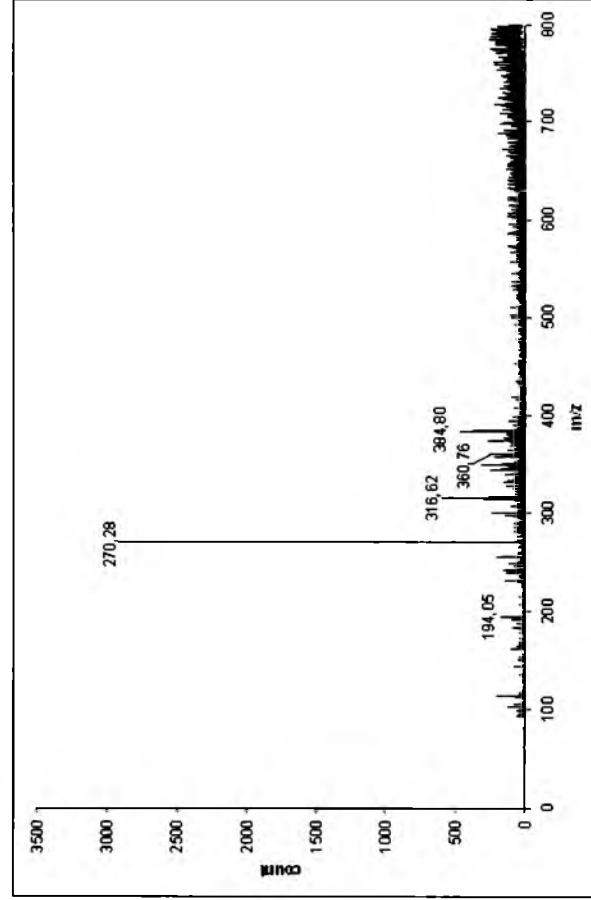


b)

Rys. 42. Widma masowe wraz z wartościami m/z dominujących sygnałów zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z ekstraktu *Salvia lavandulifolia* zawierającego kwasy fenolowe. a) Widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 41 numerem 1; b) widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 41 numerem 2. (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).



c)



d)

Rys. 42. (c.d.) Widma masowe wraz z wartościami m/z dominujących sygnałów zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z ekstraktu *Salvia lavandulifolia* zawierającego kwasy fenolowe. c) Widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 41 numerem 3; d) widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 41 numerem 4. (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).

Tab. 27. Wzory strukturalne oraz masy cząsteczkowe wybranych kwasów fenolowych, których obecność jest przewidywana w ekstraktach gatunków roślin należących do rodzaju *Salvia* [115].

Związek	Wzór strukturalny	Masa cząsteczkowa
Kwas chlorogenowy		354,31
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy		148,17
Kwas ferulowy		194,18
Kwas <i>o</i> -kumarowy		164,16
Kwas <i>p</i> -kumarowy		164,16
Kwas kawowy		180,16
Kwas protokatechowy		154,12
Kwas rozmarynowy		360,31
Kwas galusowy		170,12

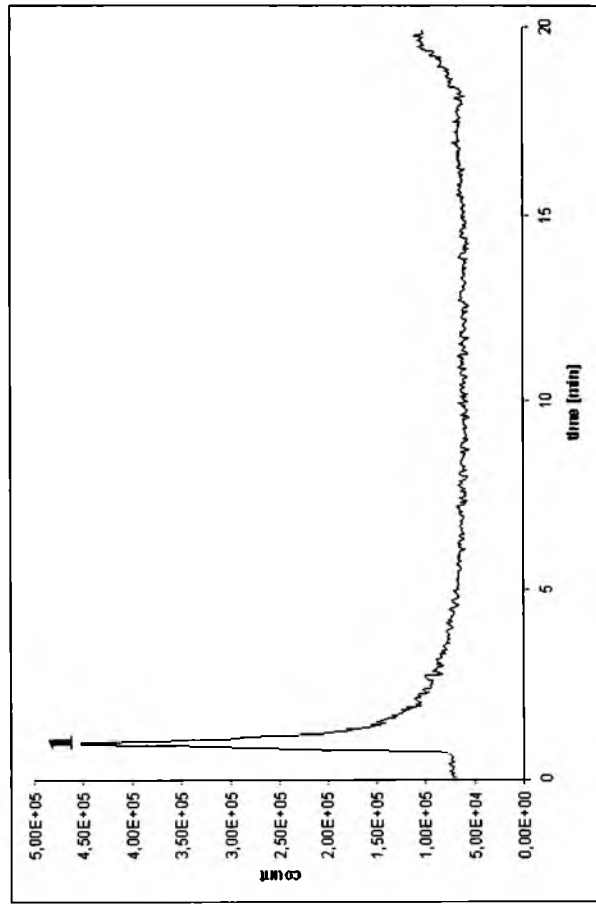
4.2.2. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie dwuwymiarowym (2D TLC-LC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym

W kolejnym etapie eksperymentu wykorzystaną uprzednio przystawkę TLC-MS połączono poprzez wysokosprawny chromatograf ciekłowy (HPLC) z detektorem masowym. Analiza polegała na wymywaniu każdego pasma przy użyciu interfejsu TLC-MS i wprowadzaniu uzyskanego eluatu do kolumny chromatografu ciekłowego, gdzie następował drugi etap rozdzielania techniką HPLC, a następnie rozdzielone frakcje kierowano do spektrometru masowego. Uzyskane chromatogramy ciekłowe wraz z widmami masowymi zarejestrowanymi w trybie 2D TLC-LC-MS dla pasm 1-4 z chromatogramu cienkowarstwowego przedstawiono na rysunkach 43-46.

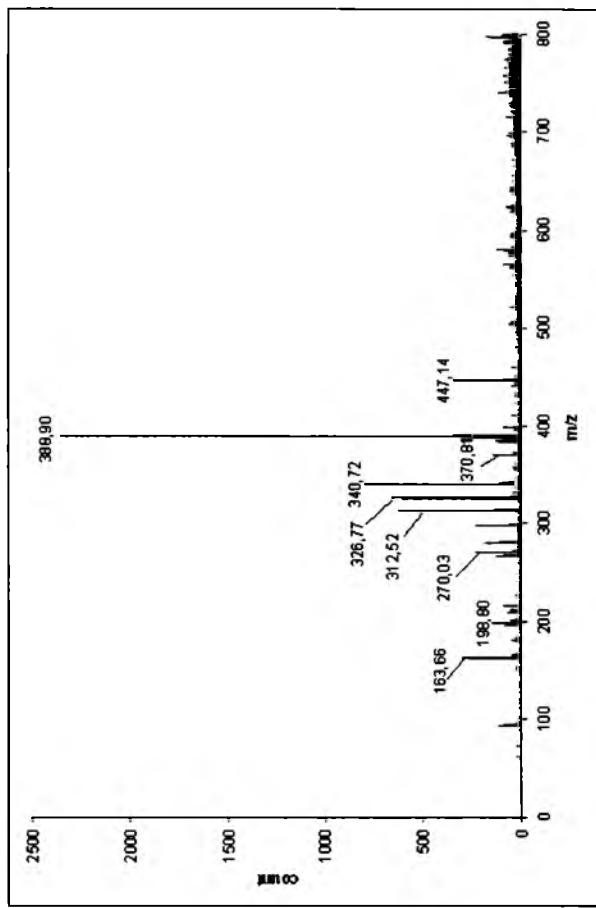
Widmo masowe uzyskane w trybie dwuwymiarowym dla pasma 1 (Rys. 43b) mimo, iż jest bardziej skomplikowane, to jednak bardzo przypomina widmo masowe otrzymane w trybie jednowymiarowym (Rys. 42a). Najbardziej intensywnym i jednocześnie występującym w obu widmach masowych sygnałem jest pik o wartości m/z równej 388,90. Sygnał ten można przypisać wielu różnym adduktom molekularnym, jednak ze względu na charakter analizowanej próbki najbardziej prawdopodobnym wydaje się addukt kwasu kawowego z kwasem cytrynowym i kwasem octowym lub dimer kwasu ferulowego.

Z kolei na rysunkach 44 b i c zaprezentowano dwa widma masowe pasma 2 z chromatogramu cienkowarstwowego otrzymane w wariancie dwuwymiarowym, które pochodzą od dwóch frakcji rozdzielonych w drugim wymiarze, tj. techniką wysokosprawnej chromatografii ciekłowej. Na tych widmach masowych można zauważyć intensywny sygnał o wartości m/z równej 360,5, który jest obecny także w widmie masowym przedstawionym na rysunku 39 b (wariant jednowymiarowy).

Na rysunkach 45 b i c oraz 46 b i c zaprezentowano po dwa widma masowe odpowiednio dla pasm 3 i 4 z chromatogramu cienkowarstwowego otrzymane w wariancie dwuwymiarowym, które podobnie, jak w przypadku pasma 2, pochodzą od dwóch frakcji rozdzielonych w drugim wymiarze. We wszystkich czterech widmach masowych widoczne są stosunkowo mało intensywne sygnały przy wartości m/z równej 163,6, które mogą pochodzić od kwasu kumarowego. W widmie masowym uzyskanym w wariancie jednowymiarowym dla pasma 3 (Rys. 41c), widoczny jest analogiczny sygnał, jednak dla pasma 4 (Rys. 41d) nie zaobserwowano jego obecności.

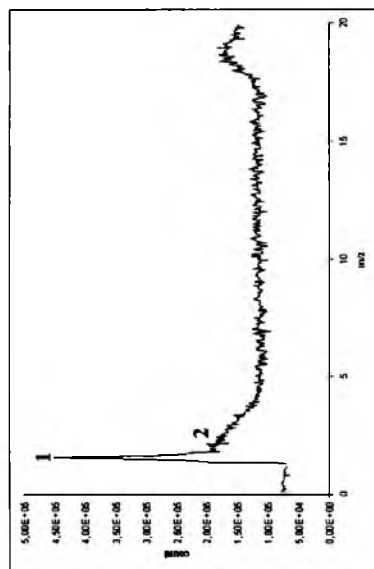


a)

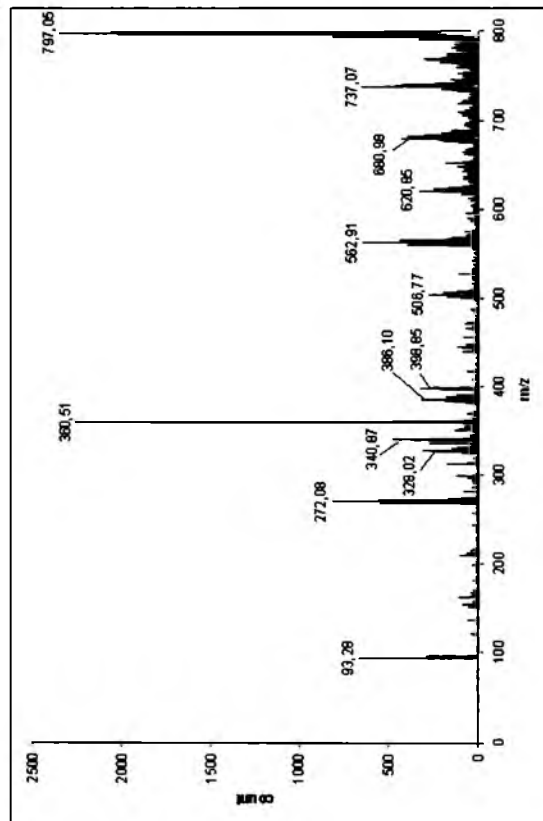


b)

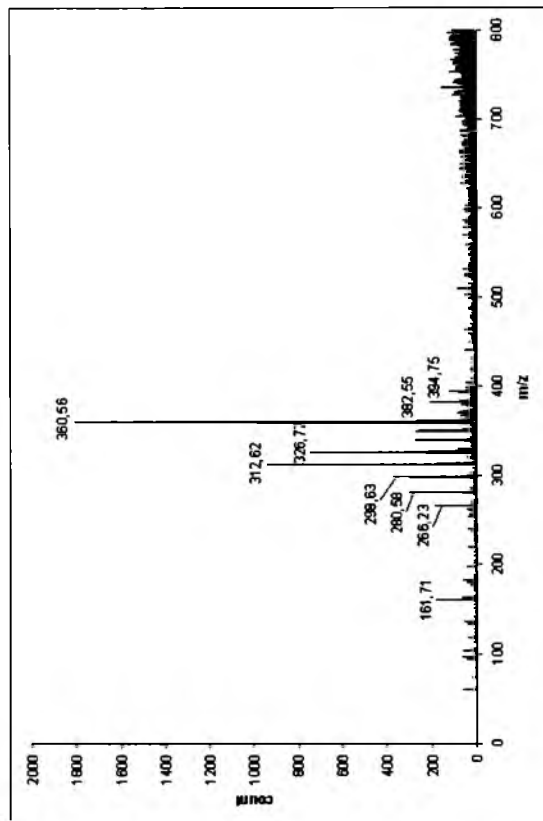
Rys. 43. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 1 (Rys. 41) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 µm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.



a)

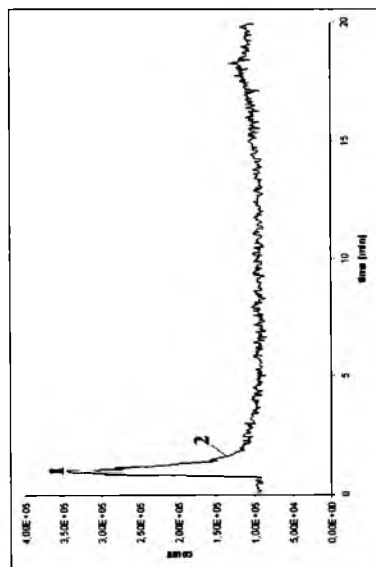


b)

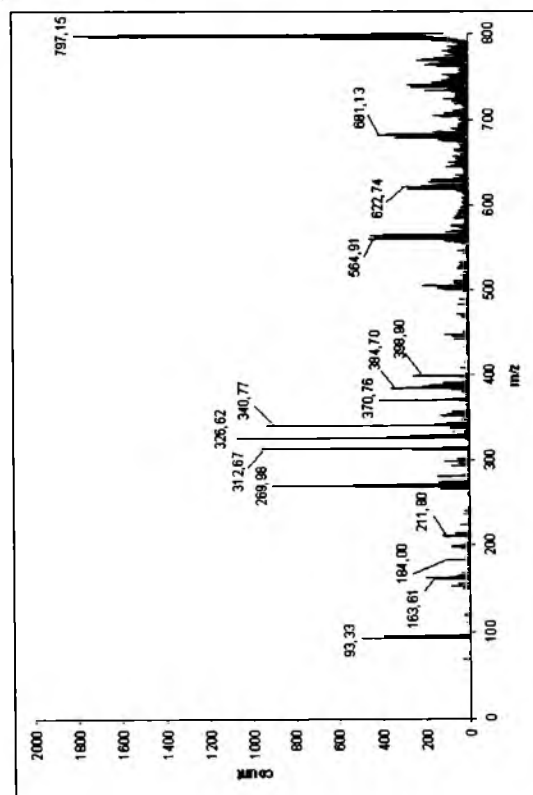


c)

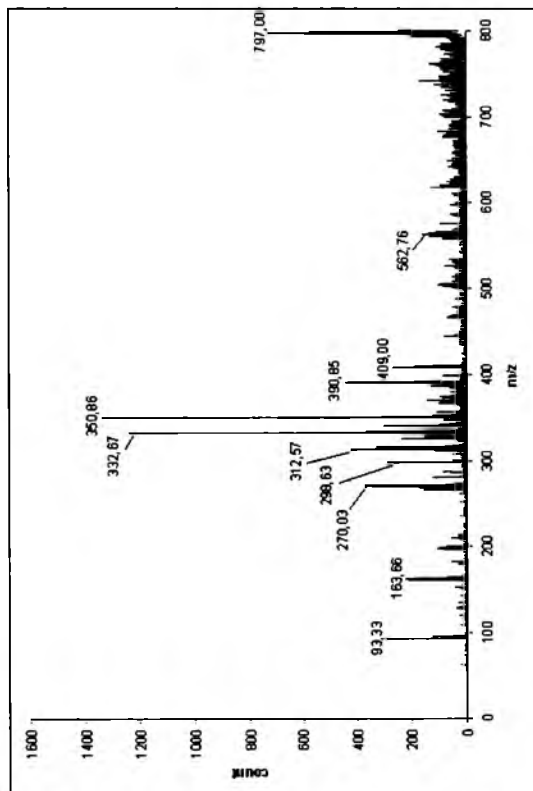
Rys. 44. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 2 (Rys. 41) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.



a)

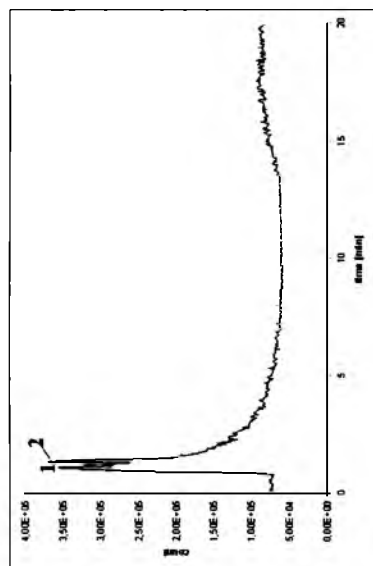


b)

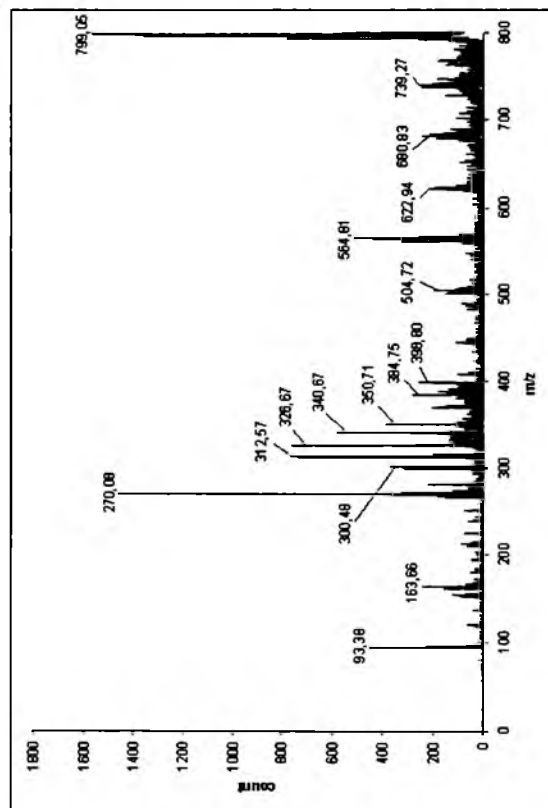


c)

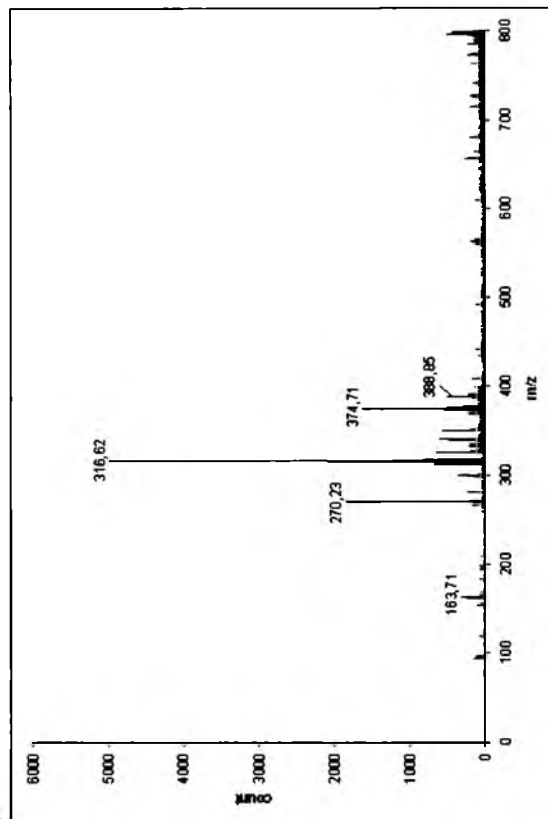
Rys. 45. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 3 (Rys. 41) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XR-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.



a)



b)



c)

Rys. 46. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 4 (Rys. 41) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.

4.2.3. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (1D RP-TLC-MS) Rozdział na fazie stacjonarnej C₁₈

Pierwszym krokiem podobnie, jak w poprzednio omówionym eksperymencie, był rozdział składników ekstraktu wyodrębnionego z gatunku *Salvia lavandulifolia* techniką chromatografii cienkowarstwowej oraz rejestracja fotograficzna i dodatkowo densytometryczna otrzymanych chromatogramów. Separację frakcji kwasów fenolowych wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz z zastosowaniem fazy stacjonarnej typu C₁₈. Na rysunku 47 przedstawiono zdjęcie otrzymanego chromatogramu wraz z odpowiadającym mu densytogramem, na którym widocznych jest osiem rozdzielonych pasm. Następnie cztery spośród tych ośmiu pasm (1, 4, 5 i 8) wyeluowano mieszaniną metanolu i kwasu octowego w stosunku objętościowym 99,5 : 0,5, stosując w tym celu interfejs TLC-MS. W ten sposób dla każdego pasma otrzymano widmo masowe, które zaprezentowano na rysunkach 48a – d.

Ponadto w tym samym eksperymencie przeprowadzono próbę identyfikacji składników rozdzielonych pasm chromatograficznych stosując w tym celu jedenaście substancji wzorcowych kwasów fenolowych. Identyfikację przeprowadzono przez porównanie wartości współczynnika retardacji (R_F) oraz koloru poszczególnych pasm substancji wzorcowych z danymi pochodzącymi od próbek. Zastosowane substancje wzorcowe wraz z ich wzorami strukturalnymi, masami cząsteczkowymi oraz współczynnikami retardacji (R_F) zestawiono w tabeli 28.

Analizując otrzymane wyniki stwierdzono, że mimo użycia jedenastu substancji wzorcowych nie udało się zidentyfikować składników zawartych w większości rozdzielonych pasm (1-3, 5 i 8). Jednakże w paśmie 4 zidentyfikowano kwas kawowy, na co dowodem jest fakt, iż zarówno pasmo próbki, jak i substancji wzorcowej, oprócz oczywistej zgodności wartości współczynników retardacji (R_F), wykazuje intensywnie niebieską fluorescencję przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ponadto w paśmie 6 zidentyfikowano kwas rozmarynowy, a w paśmie 7 kwas chlorogenowy. Kolejność zidentyfikowanych substancji na uzyskanym chromatogramie pozostaje zgodna ze strukturą wykrytych związków. Otóż kwas kawowy zidentyfikowany jako składnik pasma 4 (zawierający w swej cząsteczce dwie grupy hydroksylowe w pozycji umożliwiającej tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych) wykazuje większe powinowactwo do niepolarniej fazy stacjonarnej, aniżeli kwas rozmarynowy zidentyfikowany jako składnik pasma 6 (zawierający w swej cząsteczce pięć grup hydroksylowych). Natomiast najmniejsze powinowactwo do niepolarniej fazy stacjonarnej wykazuje kwas chlorogenowy (składnik pasma 7), gdyż w swej cząsteczce zawiera siedem grup hydroksylowych.

Przedstawione w niniejszym rozdziale widma masowe zostały zarejestrowane tylko dla wybranych pasm chromatograficznych (1, 4, 5 i 8), gdyż głównym metodycznym celem tych badań było wykazanie na wybranych przykładach przydatności zastosowanych technik analitycznych (1D RP-TLC-MS oraz 2D RP-TLC-LC-MS) do konstrukcji charakterystycznych fingerprintów dla próbek pochodzenia naturalnego.

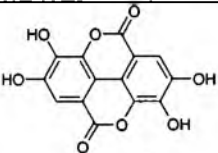
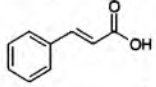
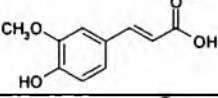
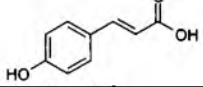
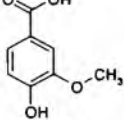
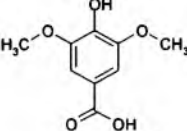
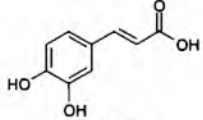
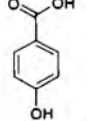
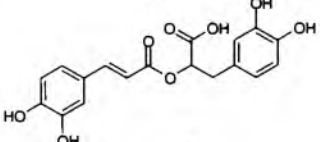
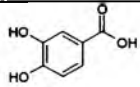
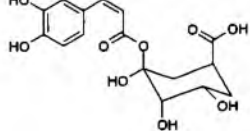
Zastosowanie identycznych warunków akwizycji widm masowych dla różnych chromatogramów cienkowarstwowych uzyskanych dla tego samego ekstraktu *Salvia lavandulifolia* zawierającego kwasy fenolowe miało na celu sprawdzenie

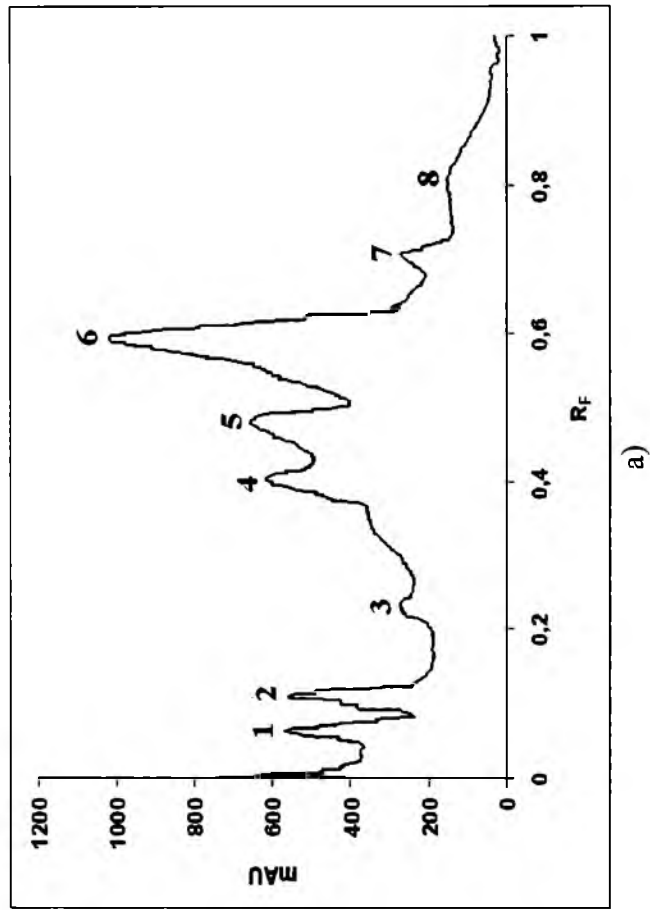
powtarzalności przeprowadzonego eksperymentu. Porównując widma masowe pochodzące z różnych analiz potwierdzono powtarzalność uzyskanych wyników, zaobserwowano bowiem występowanie analogicznych sygnałów w porównywanych widmach masowych, jak również stwierdzono podobieństwo niektórych uzyskanych profili.

Przed przystąpieniem do dalszego omawiania otrzymanych wyników w tym miejscu przedstawimy pewne ogólne stwierdzenia dotyczące kwasów fenolowych występujących w badanych próbkach szaławii. Otóż podstawowym budulcem dwóch spośród trzech zidentyfikowanych przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej kwasów fenolowych (tj. kwasu kawowego, kwasu rozmarynowego i kwasu chlorogenowego) jest kwas kawowy. Ponadto, jak już wspomniano we wcześniejszym rozdziale, z informacji zawartych w literaturze na temat składu chemicznego frakcji kwasów fenolowych występujących w różnych gatunkach szaławii wynika, że trimery kwasu kawowego stanowią największą grupę metabolitów wtórnych zawartych w roślinach z rodzaju *Salvia* [180].

W widmach masowych prezentowanych na rysunkach 48a-d, zarejestrowanych dla wybranych pasm chromatograficznych (1, 4, 5 i 8) wyeluowanych przy użyciu interfejsu TLC-MS i skierowanych bezpośrednio do spektrometru masowego, zaobserwowano charakterystyczny i zarazem, w większości przypadków, intensywny sygnał o wartości m/z równej około 198, który może pochodzić od adduktu molekularnego kwasu kawowego i wody. Ponadto inną charakterystyczną cechą czterech zaprezentowanych widm masowych jest obecność sygnałów w zakresie m/z powyżej 400, które mogą pochodzić od adduktów kwasów fenolowych zawartych w badanych próbkach. Istnieje możliwość polimeryzacji składników próbki bezpośrednio w układzie ESI-MS.

Tab. 28. Wykaz substancji wzorcowych wykorzystanych podczas analizy ekstraktu *Salvia lavandulifolia* techniką chromatografii cienkowarstwowej wraz z ich wzorami strukturalnymi, masami cząsteczkowymi oraz współczynnikami retardacji (R_F).

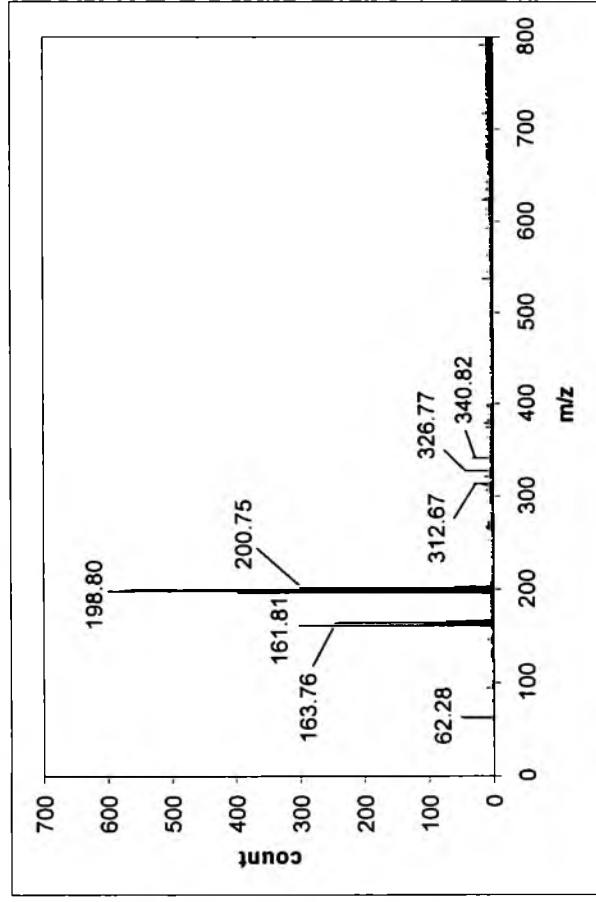
Wzorzec	Wzór strukturalny	Masa cząsteczkowa	R_F	Nr pasma
Kwas elagowy		302,20	0,15 (tailing)	-
Kwas <i>trans</i> -cynamonowy		148,17	0,19	-
Kwas ferulowy		194,18	0,42	-
Kwas <i>p</i> -kumarowy		164,16	0,44	-
Kwas wanilinowy		168,15	0,52	-
Kwas syringowy		198,17	0,53	-
Kwas kawowy		180,16	0,54	4
Kwas <i>p</i> -hydroksybenzoesowy		138,12	0,55	-
Kwas rozmarynowy		360,31	0,58	6
Kwas protokatechowy		154,12	0,68	-
Kwas chlorogenowy		354,31	0,71 (ogonuje)	7



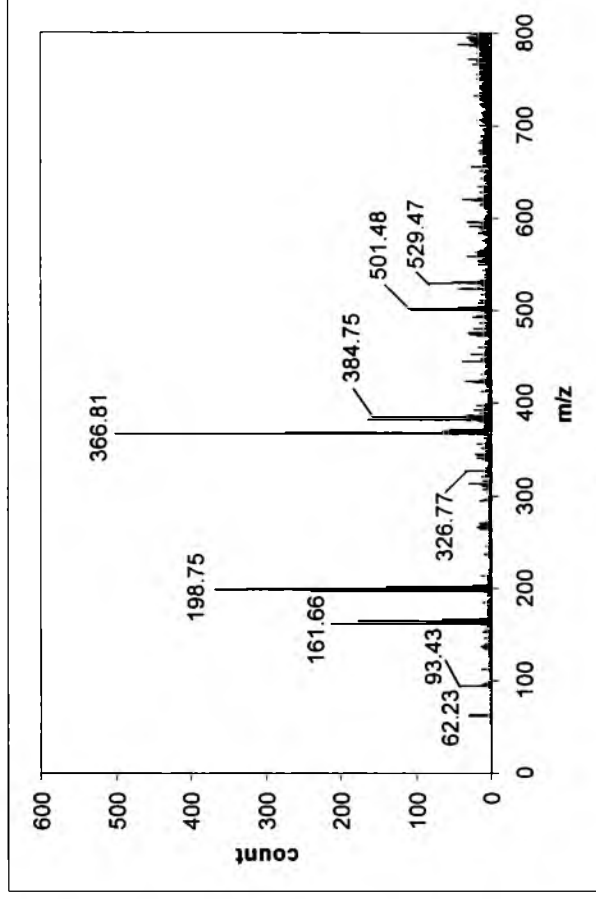
b)



Rys. 47. a) Densytogram oraz zdjęcie chromatogramu selektywnie wyekstrahowanej frakcji kwasów fenolowych z *Salvia lavandulifolia*. Faza stacjonarna: RP 18. Faza ruchoma: metanol + woda + kwas octowy w stosunku objętościowym 5 : 5 : 0,1. Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja fotograficzna chromatogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Ekstrakt nanoszono w ilości 25 μ l.

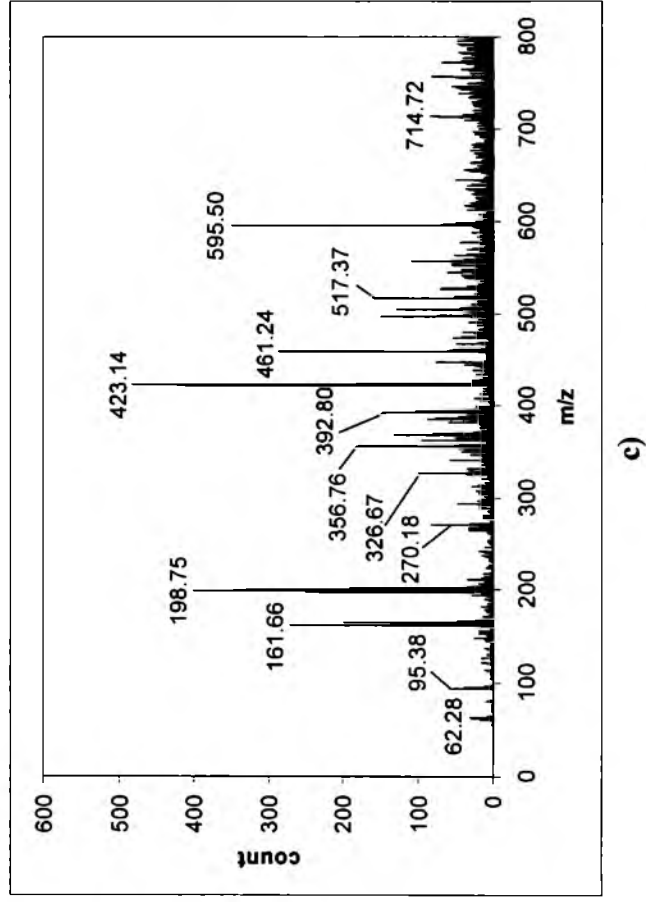


a)

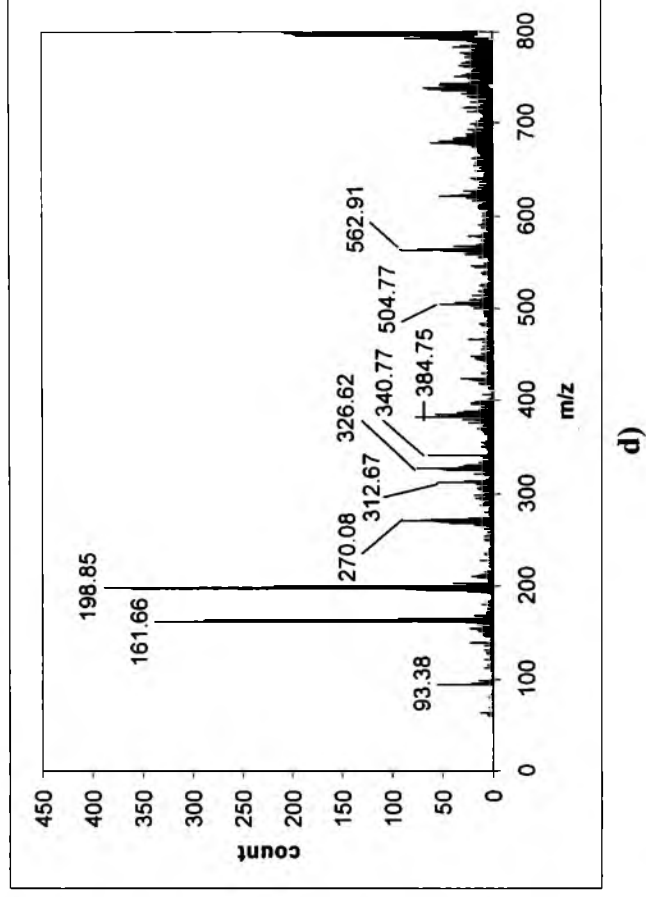


b)

Rys. 48. Widma masowe wraz z wartościami m/z dominujących sygnałów zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z ekstraktu *Sabia lavandulifolia* zawierającego kwasy fenolowe. a) Widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 47 numerem 1; b) widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 47 numerem 4. (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).



c)



d)

Rys. 48. (c.d.) Widma masowe wraz z wartościami m/z dominujących sygnałów zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z ekstraktu *Salvia lavandulifolia* zawierającego kwasy fenolowe. c) Widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 47 numerem 5; d) widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 47 numerem 8. (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).

4.2.4. Analiza frakcji kwasów fenolowych techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie dwuwymiarowym (2D RP-TLC-LC-MS). Rozdział na fazie stacjonarnej C₁₈

Podobnie jak w poprzednim eksperymencie, kolejnym etapem badań było połączenie wykorzystanej uprzednio przystawki TLC-MS poprzez wysokosprawną chromatograf cieczerowy (HPLC) z detektorem masowym. Również w tym przypadku analiza polegała na wymywaniu każdego pasma przy użyciu interfejsu TLC-MS i wprowadzaniu uzyskanego eluatu do kolumny chromatografu cieczerowego, gdzie następował drugi etap rozdzielania techniką HPLC, a następnie rozdzielone frakcje kierowano do spektrometru masowego. Uzyskane chromatogramy cieczerowe wraz z widmami masowymi zarejestrowanymi w trybie 2D RP-TLC-LC-MS dla czterech pasm z chromatogramu cienkowarstwowego, oznaczonych na rysunku 47 odpowiednio numerami 1, 4, 5 i 8 przedstawiono na rysunkach 49-52.

Podobieństwo widm masowych uzyskanych w obu zastosowanych wariantach analizy wydaje się być oczywiste i w pewnym sensie oczekiwane. Na widmach masowych uzyskanych zarówno w układzie jedno-, jak i dwuwymiarowym zaobserwowano wiele charakterystycznych sygnałów o stosunkowo wysokich wartościach m/z (Rys. 49-52). Sygnały te, jak już wcześniej zaznaczono, mogą pochodzić od trimerów kwasu kawowego i jego pochodnych. Na przykład na widmie masowym uzyskanym w układzie dwuwymiarowym dla pasma 1 (Rys. 49b) widoczny jest sygnał o wartości m/z równej 535,47, który może pochodzić od anionu [sagekumaryna – H]⁻, natomiast sygnał przy wartości m/z = 360,71 można przypisać dimerom kwasu kawowego, lub też jonowi molekularnemu kwasu rozmarynowego, a dokładniej jego pochodnej, np. glikozydowej. Na widmie masowym zarejestrowanym dla drugiej frakcji rozdzielonej w drugim wymiarze, a uzyskanym dla pasma 1 (Rys. 49c), zaobserwowano sygnał o wartości m/z równej 539,72, który może pochodzić od anionu [kwas junanowy D – H]⁻.

Hydrofobowa powierzchnia zastosowanej fazy stacjonarnej typu C₁₈ okazała się lepszym układem do rozdzielania kwasów fenolowych, niż użyty wcześniej żel krzemionkowy. Zastosowana w niniejszym eksperymencie faza stacjonarna typu C₁₈ bez przeszkód pozwoliła na wykorzystanie wzorców w celach identyfikacyjnych. Mimo świadomości faktu, iż porównania współczynników retardacji (R_F) oraz koloru poszczególnych pasm wzorców z danymi pochodzącymi od analizowanej próbki nie można uznać za ostateczny dowód poprawnej identyfikacji, to jednak w połączeniu z przedstawionymi dalej obserwacjami porównanie takie może stanowić dobrą wskazówkę.

Planując niniejszy eksperyment zdawano sobie sprawę, że większości użytych w nim wzorców kwasów fenolowych (tj. kwasów elagowego, ferulowego, *p*-kumarowego, wanilinowego, syringowego, kawowego, *p*-hydroksybenzoesowego, protokatechowego i chlorogenowego) z wyjątkiem kwasu rozmarynowego nie udało się dotychczas zidentyfikować w gatunku *Salvia lavandulifolia* [181]. Uzyskane wyniki wydają się w większości potwierdzać te wcześniejsze ustalenia z wyjątkiem dwóch kwasów fenolowych, a mianowicie kwasu kawowego i kwasu chlorogenowego. Co jest być może najważniejsze w przeglądowym artykule dotyczącym identyfikacji związków fenolowych dla roślin z rodzaju *Salvia* to to, iż obecność kwasu chlorogenowego w roślinach z rodziny *Lamiaceae* jest niezwykle rzadka. Przeprowadzone przez nas wcześniejsze eksperymenty również nie potwierdziły obecności kwasu chlorogenowego w ekstraktach *S. lavandulifolia*, jednak na podstawie analizy binarnych fingerprintów

HPTLC metanolowych ekstraktów omawianego gatunku szalwii potwierdzono obecność kwasu kawowego. Można zatem stwierdzić, iż otrzymane w tym eksperymencie wyniki wnoszą istotny wkład w identyfikację składników frakcji zawierającej kwasy fenolowe.

Zaobserwowano, że na płytkach typu C_{18} kwas chlorogenowy silnie ogonował. Przyczyną tego może być częściowa hydroliza tego glikozydu na aglikon i resztę cukrową pod wpływem kwasu octowego, wchodzącego w skład fazy ruchomej. Innym powodem ogonowania kwasu chlorogenowego może być jego struktura, gdyż zawiera on w swej cząsteczce pięć grup hydroksylowych. Trzy spośród tych pięciu grup hydroksylowych należą do reszty cukrowej i w konformacji krzesłkowej występują odpowiednio w pozycji aksjalnej i ekwatorialnej i dlatego nie mogą utworzyć międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Jednakże grupy te mogą oddziaływać z nie związanymi grupami silanowymi (Si-OH pochodzącymi od krzemionkowej matrycy fazy typu C_{18}) poprzez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, przyczyniając się w ten sposób do zaobserwowanego efektu ogonowania.

Odnieśmy się jednak do wyników analizy spektrometrycznej. Jak wynika z literatury [115], trimery kwasu kawowego stanowią największą grupę metabolitów wtórnych w roślinach z rodzaju *Salvia*, o czym wspomiano już w poprzednich rozdziałach. Należą do nich takie związki, jak kwas litospermowy, sagekumaryna, kwasy salwianolowe H, I, J i K, a także kwasy junanowe C, D, E i F, których masy cząsteczkowe wynoszą ponad 520 g/mol. Tak, więc sygnały obecne w widmach masowych o wartości m/z większej niż 400 prawdopodobnie pochodzą od trimerów kwasów fenolowych.

Na koniec, można stwierdzić, że rezultaty przeprowadzonych eksperymentów opierających się na dwóch zastosowanych wariantach analizy (1D RP-TLC-MS oraz 2D RP-TLC-LC-MS) są ważne z punktu widzenia przyszłego fingerprintowania dowolnego materiału roślinnego.

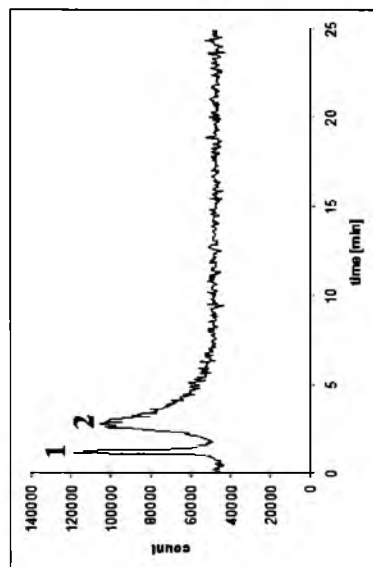
Niemniej złożoność fingerprintów masowych sprawiła, iż ich bezpośrednie wizualne porównanie staje się dość trudne i dlatego potrzebne jest znalezienie odpowiedniego rozwiązania chemometrycznego, które umożliwiłoby dokładniejsze wykorzystanie bogactwa informacji zawartych w widmach masowych próbek pochodzenia naturalnego.

Podsumowując, zastosowanie fazy stacjonarnej typu C_{18} okazało się najlepszym wyborem adsorbentu dla grupowego rozdziału kwasów fenolowych, selektywnie wyekstrahowanych z *S. lavandulifolia* oraz do identyfikacji składników tego ekstraktu z użyciem substancji wzorcowych.

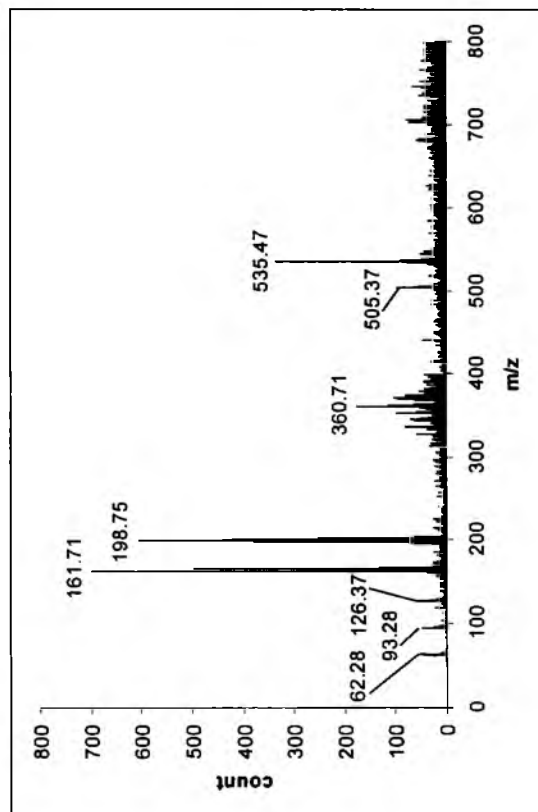
Z wyników uzyskanych przy zastosowaniu chromatografii cienkowsarstwowej wynika, że ekstrakt *S. lavandulifolia* zawiera kwas chlorogenowy, którego wcześniej nie zidentyfikowano w tym konkretnym gatunku.

Na podstawie fingerprintowania przy użyciu spektrometrii masowej ekstraktu zawierającego kwasy fenolowe, pokazano, że wstępny rozdział takiego ekstraktu (TLC), a następnie wykorzystanie dwóch wariantów analizy, tj. 1D RP-TLC-MS oraz 2D RP-TLC-LC-MS, dostarcza wielu informacji, które mogą być wykorzystane w chemotaksonomii, jak również mogą posłużyć do celów identyfikacyjnych roślin.

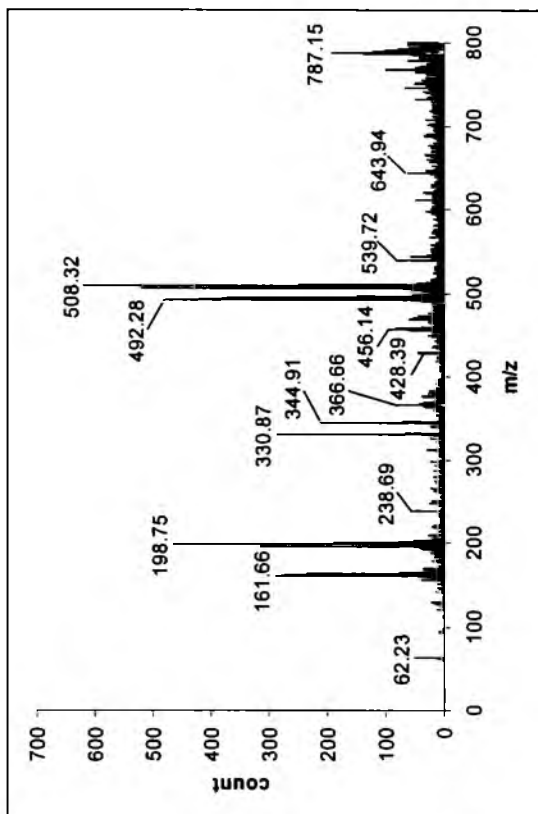
Należy także podkreślić, że przypisanie pewnych sygnałów z widm masowych do wybranych substancji chemicznych może być uznane jedynie za orientacyjne i prowizoryczne, gdyż w omówionym eksperymencie nie przeprowadzono odpowiedniej analizy identyfikacyjnej.



a)

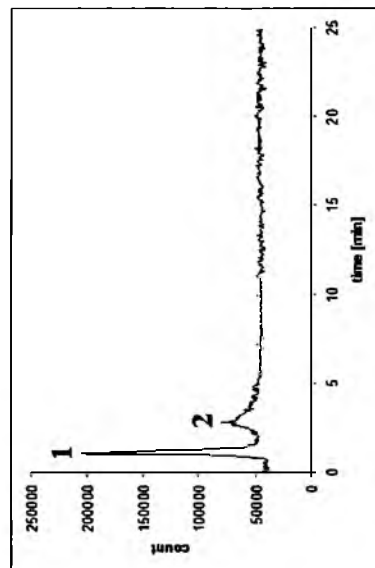


b

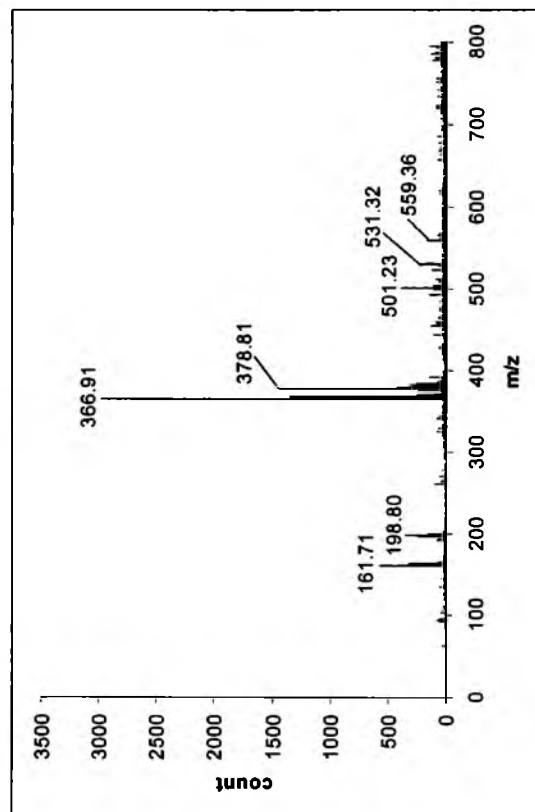


c)

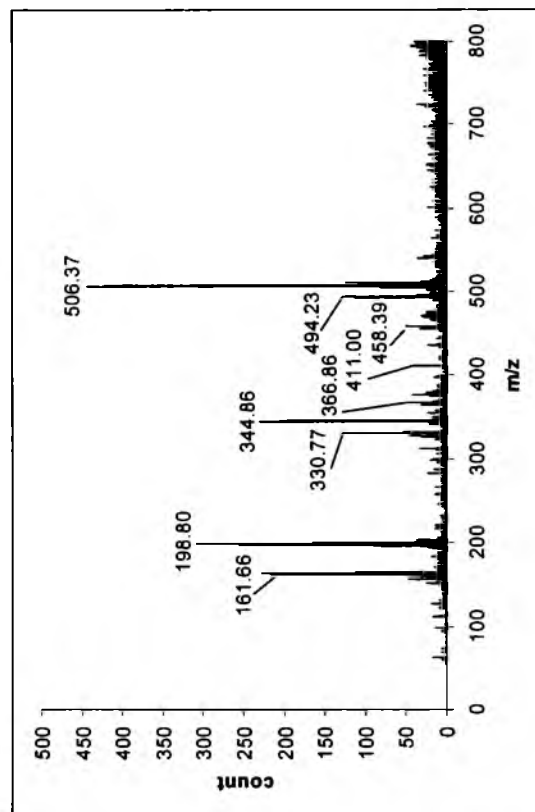
Rys. 49. a) Chromatogram ciekowy zarejestrowany dla pasma 1 (Rys. 47b) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu ciekowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla pików 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla pików 2; (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XR-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C, jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).



a)

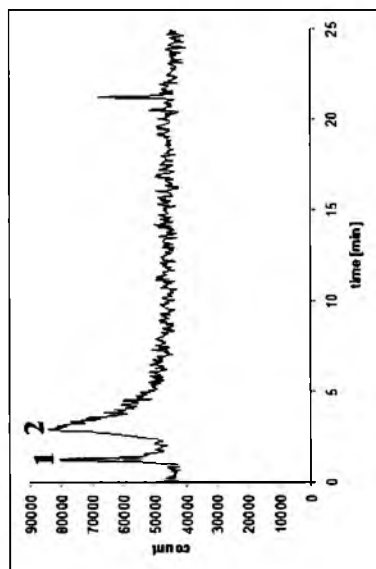


b)

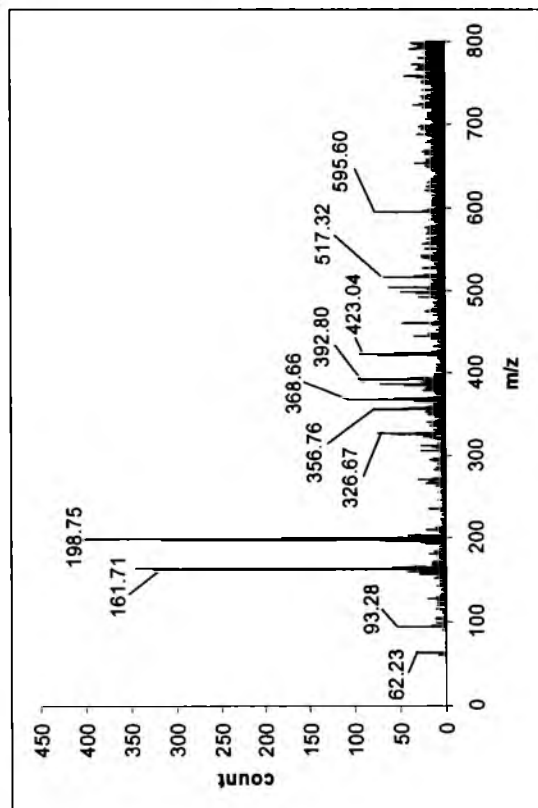


c)

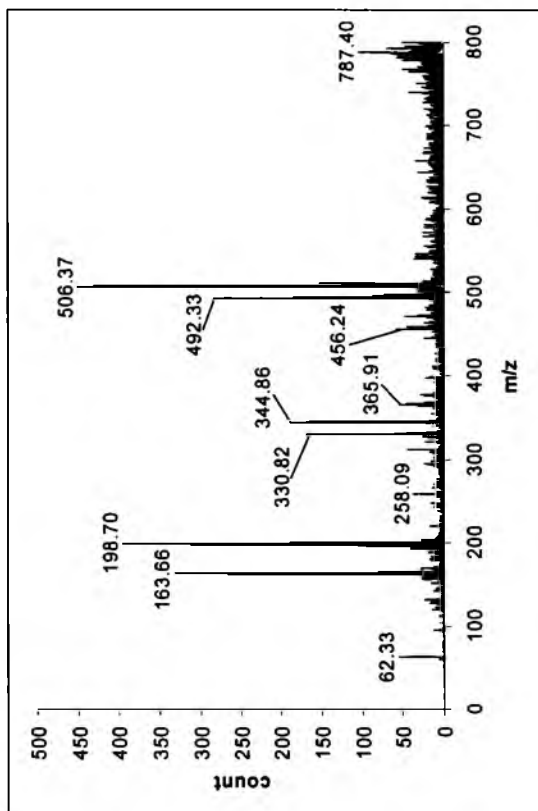
Rys. 50. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 4 (Rys. 47b) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla pików 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla pików 2; (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian 500-MS, wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).



a)

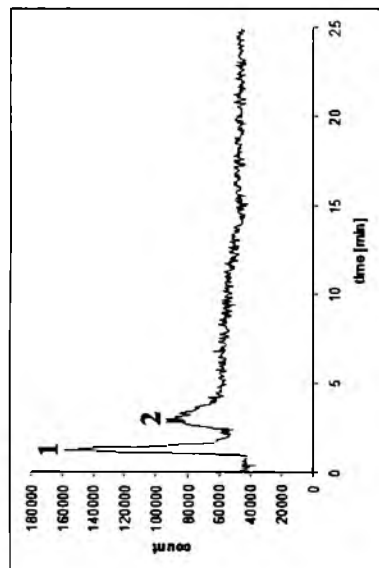


b)

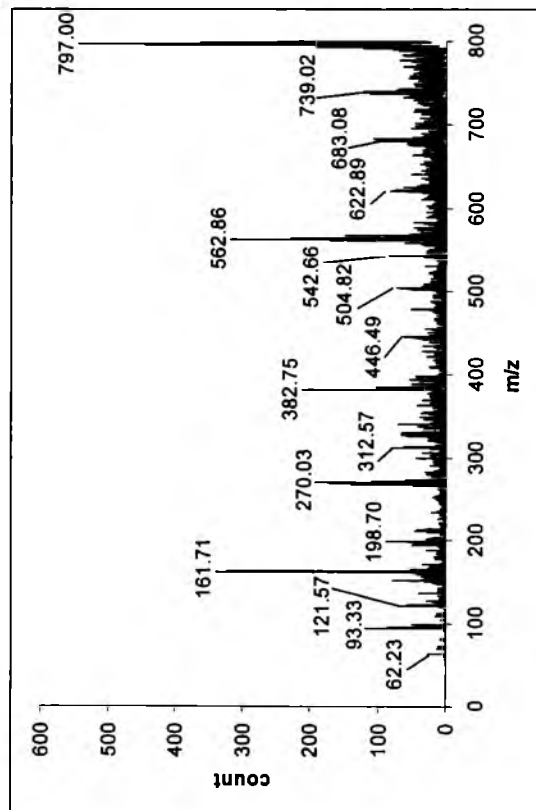


c)

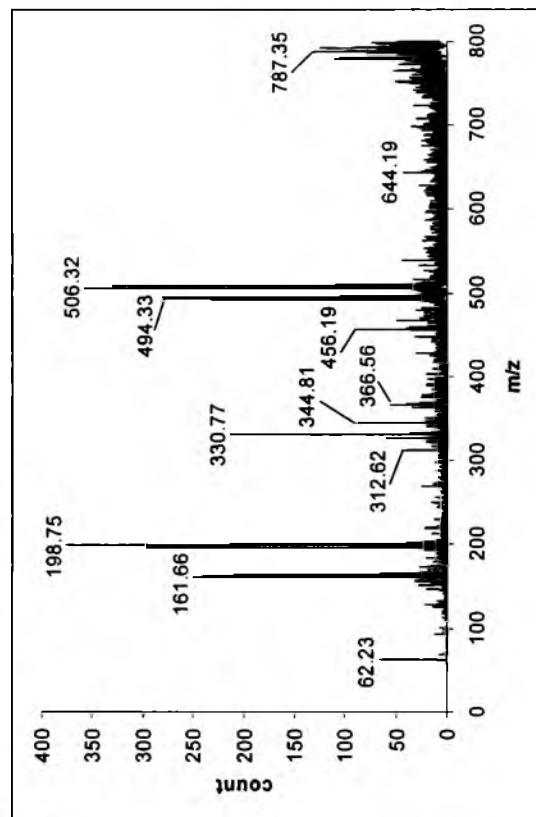
Rys. 51. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 5 (Rys. 47b) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla pików 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla pików 2; (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typ Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).



a)



b)



c)

Rys. 52. a) Chromatogram ciekzowy zarejestrowany dla pasma 8 (Rys. 47b) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu ciekzowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; jonizacja negatywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).

4.3. Analiza frakcji flawonoidów wyodrębnionych w procesie selektywnej ekstrakcji techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas

4.3.1. Analiza frakcji flawonoidów techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (1D TLC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym

Ekstrakty zawierające flawonoidy wyodrębnione z gatunku *Salvia lavandulifolia* badano również za pomocą chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrem masowym w dwóch wariantach, a wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rysunkach 53-59.

Flawonoidy są szeroko rozpowszechnione w różnych gatunkach roślin z rodzaju *Salvia* i występują głównie jako flawony i flawonole, a także ich glikozydy. Na podstawie przeglądowego artykułu [115] sporządzono tabelę 29, w której wymieniono zarówno aglikony, jak i glikozydy tych grup związków charakterystyczne dla gatunku *Salvia lavandulifolia*.

Większość flawonoidów obecnych w gatunkach z rodzaju *Salvia* to pochodne apigeniny i luteoliny oraz ich pochodnych 6-hydroksylowych. Kemferol i kwercetyna, a także ich pochodne są również uznawane za stosunkowo rozpowszechnione substancje wśród roślin z rodzaju *Salvia*, jednak ich obecność nie została potwierdzona dla gatunku *Salvia lavandulifolia* [115], co zgadza się z przedstawionymi poniżej wynikami przeprowadzonych przez nas badań.

Spośród glikozydów flawonów i flawonoli pochodne luteoliny występują stosunkowo najczęściej w roślinach z rodzaju *Salvia*, co m.in. potwierdza obecność 7-glikozydu luteoliny (cynarozydu) w gatunku *Salvia lavandulifolia*.

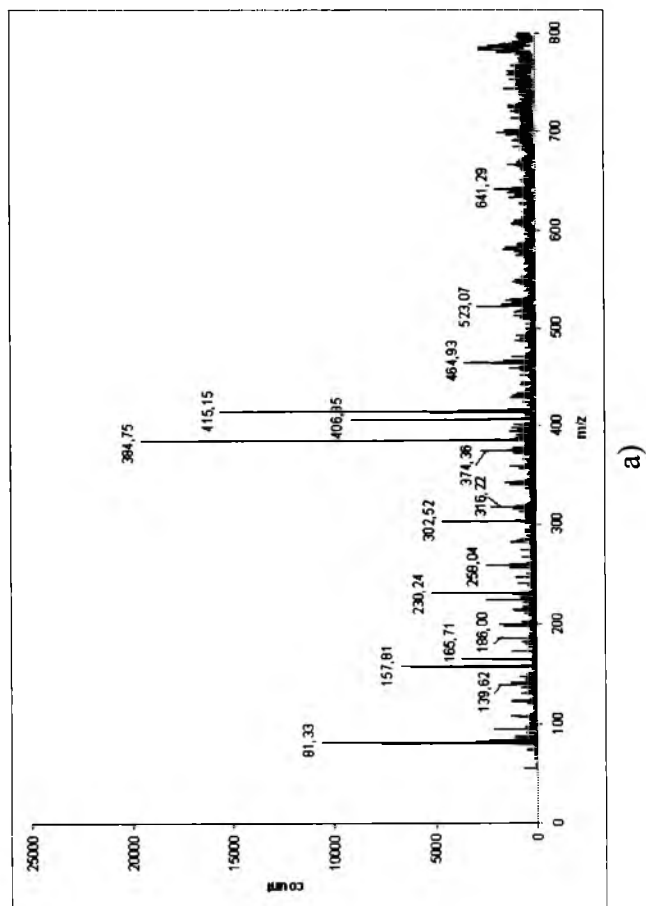
Podobnie, jak w przypadku kwasów fenolowych pierwszym krokiem w przeprowadzonym eksperymencie był rozdział składników ekstraktu wyodrębnionego z gatunku *Salvia lavandulifolia* techniką chromatografii cienkowarstwowej oraz rejestracja fotograficzna otrzymanych chromatogramów (Rys. 53). Następnie każde z czterech rozdzielonych pasm wymyto z płytki chromatograficznej przy użyciu interfejsu TLC-MS. W ten sposób dla każdego pasma otrzymano widmo masowe, które zaprezentowano na rysunkach 54a – d.

Na widmach tych można rozpoznać jony molekularne charakterystyczne dla niektórych flawonoidów wymienionych w tabeli 29. Są to sygnały o wartościach m/z równych 284,43 (Rys. 54d), 316,22 (Rys. 54a), 464,93 (Rys. 54a) i 595,35 (Rys. 54c), które mogą pochodzić odpowiednio od genkwaniny, nepetyny, izokwercytryny, oraz 5-rutynozydu luteoliny.

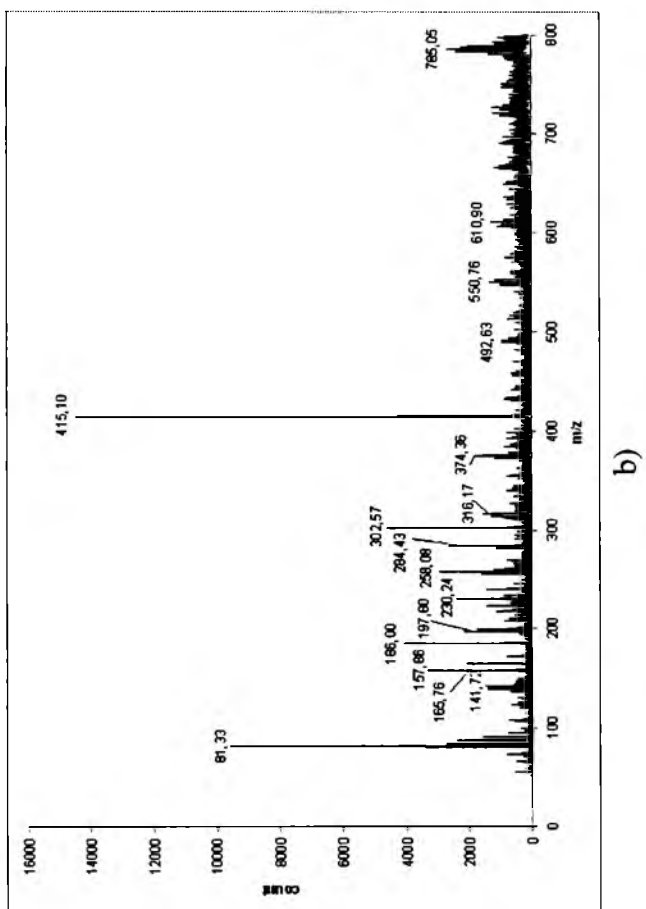
Z kolei sygnał o wartości m/z równej 302,6, obecny we wszystkich czterech widmach masowych można zasadniczo przypisać jonom adduktów pochodzących od odpowiednich jonów molekularnych w połączeniu z H, He, lub MeOH. Na przykład, sygnał o wartości m/z równej 302,6 można przypisać następującym jonom [apigenina + MeOH]⁺, [hispidulina + He]⁺, natomiast aglikon może pochodzić od jonu [izokwercytryna + H]⁺. Nie można jednak wykluczyć, że wymienione jony powstały w wyniku fragmentacji. Analizując masy cząsteczkowe zarówno aglikonów, jak i glikozydów flawonoidowych stwierdzono, że sygnały w zakresie m/z poniżej 284 zazwyczaj pochodzą z procesów fragmentacji.



Rys. 53. Zdjęcie chromatogramu ekstraktu rośliny z gatunku *Salvia lavandulifolia* zawierającego flawonoidy. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: octan etylu + toluen + kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 5 : 5 : 0,1. Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja fotograficzna chromatogramu przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Ekstrakt naniesiono w ilości 40 μl .

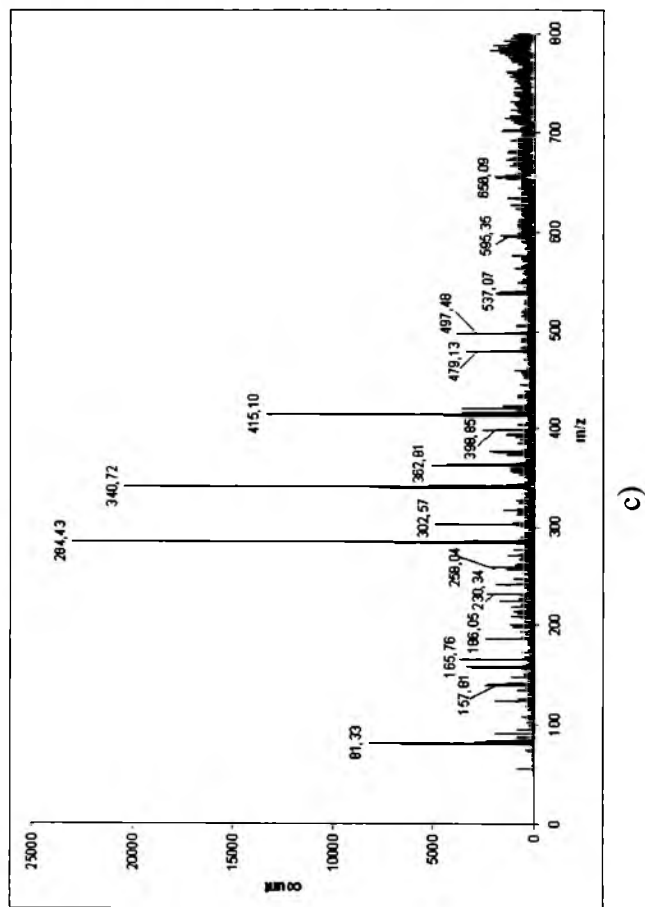


a)

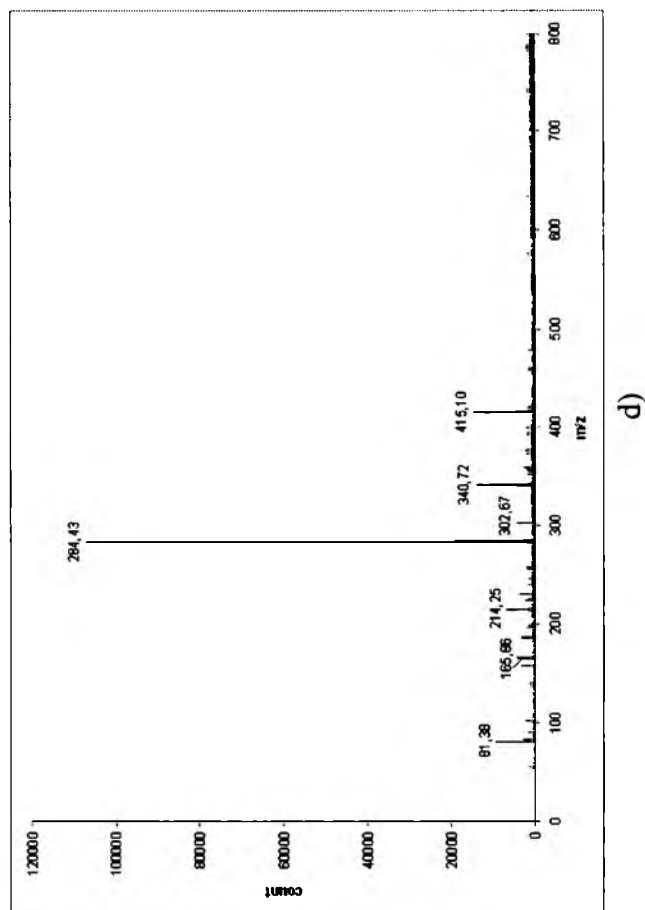


b)

Rys. 54. Widma masowe wraz z wartościami m/z dominujących sygnałów zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z ekstraktu *Salvia lavandulifolia* zawierającego flawonoidy. a) Widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 53 numerem 1; b) widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 53 numerem 2. (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C, jonizacja pozytywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min).



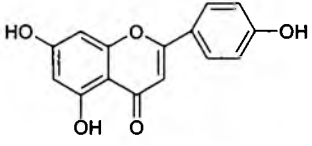
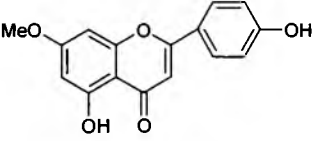
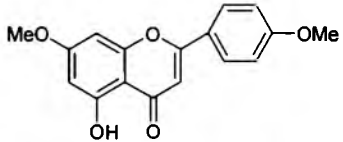
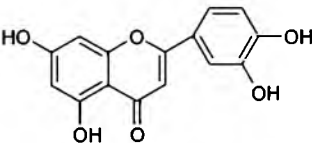
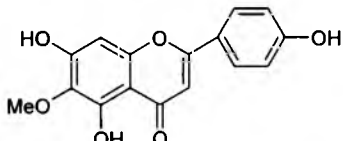
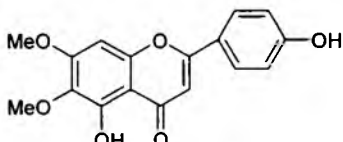
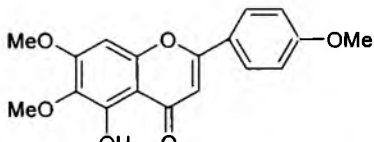
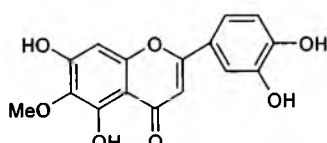
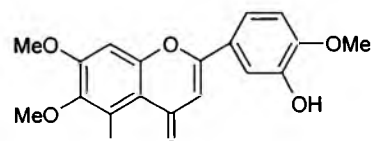
c)



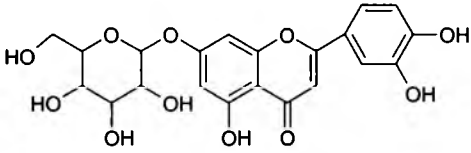
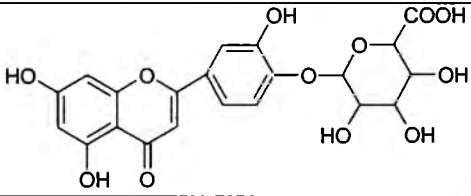
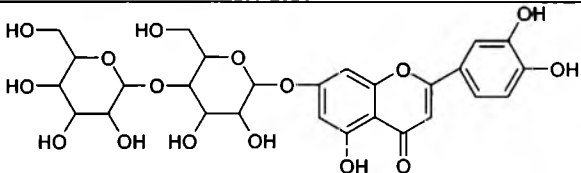
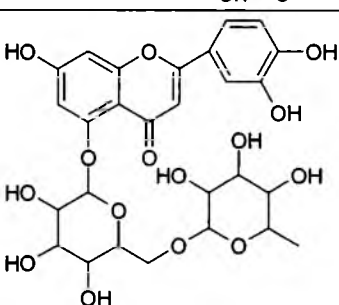
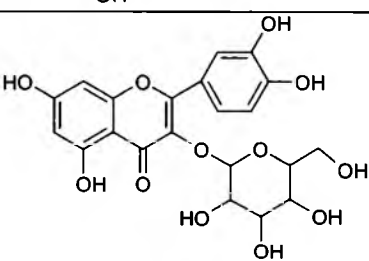
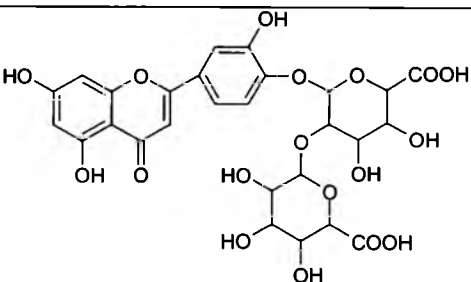
d)

Rys. 54. (c.d.) Widma masowe wraz z wartościami m/z dominujących sygnałów zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z ekstraktu *Salvia lavandulifolia* zawierającego flawonoidy. c) Widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 53 numerem 3; d) widmo masowe zarejestrowane dla pasma chromatograficznego oznaczonego na rysunku 53 numerem 4. (ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C jonizacja pozytywna; ciśnienie 25Pa, napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min)

Tab. 29. Wzory strukturalne oraz masy cząsteczkowe wybranych aglikonów i glikozydów flawonów oraz flawonoli, których obecność jest przewidywana w ekstraktach *Salvia lavandulifolia* [115].

Związek	Wzór strukturalny	Masa cząsteczkowa
Aglikony		
Apigenina		270,24
Genkwanina		284,27
Eter 7,4'-dimetyloapigeniny		298,30
Luteolina		286,24
Hispidulina		300,27
Cyrsimarytina		314,30
Salwigenina		328,32
Nepetyna		316,27
Eupatoryna		344,32

Tab. 29. (c.d.)

Związek	Wzór strukturalny	Masa cząsteczkowa
Glikozydy		
Cynarozyd		448,38
4'-Glukuronid luteoliny		462,08
7-Celobiozyd luteoliny		628,54
5-Rutynozyd luteoliny		594,16
Izokwerцыtryna		464,38
4'-O-Diglukuronid luteoliny		638,11

4.3.2. Analiza frakcji flawonoidów techniką chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas w wariancie dwuwymiarowym (2D TLC-LC-MS). Rozdział na żelu krzemionkowym

Na widmach masowych otrzymanych w wariancie jednowymiarowym (TLC-MS) w przeciwieństwie do widm uzyskanych w trybie dwuwymiarowym (TLC-LC-MS) nie zaobserwowano intensywnych sygnałów powyżej wartości m/z równej 400 (najprawdopodobniej jest ona charakterystyczna dla cięższych flawonów i glikozydów flawonoli). Sygnały o wyższych wartościach m/z mogą również pochodzić od jonów molekularnych różnych adduktów. Na przykład, sygnały o wartościach m/z równych 651,79 (Rys. 55c) i 471,48 (Rys. 56c) można odpowiednio przypisać następującym jonom $[7\text{-celobiozyd luteoliny} + \text{Na}]^+$ i $[\text{cynarozyd} + \text{Na}]^+$, natomiast sygnał przy wartości $m/z = 481,33$ (Rys. 57c) może pochodzić od jonów $[\text{cynarozyd} + \text{H} + \text{MeOH}]^+$ lub $[4'\text{-glukuronian lutoliny} + \text{H} + \text{H}_2\text{O}]^+$.

Z kolei we wszystkich widmach masowych zarejestrowanych zarówno w wariancie TLC-MS, jak również TLC-LC-MS widoczny jest sygnał o stosunkowo niewielkiej intensywności, o wartości m/z równej około 302. Co więcej, w większości widm uzyskanych w tym eksperymencie widoczny jest sygnał o wartości m/z równej 94. Sygnał ten najprawdopodobniej pochodzi z fragmentów $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, które oddzieliły się od apigeniny i/lub jej pochodnych (tj. od genkwaniny, hispiduliny i cyrsimarytyny).

Widmo masowe zarejestrowane dla pasma 4 z chromatogramu cienkowarstwowego uzyskane w wariancie jednowymiarowym jest stosunkowo proste (Rys. 54d), natomiast w trybie dwuwymiarowym na chromatogramie cieczowym można zaobserwować trzy piki (Rys. 58a), dla których zostały odpowiednio zarejestrowane trzy widma masowe, które są znacznie bardziej złożone (Rys. 58b - d). Jest to wystarczający dowód na to, że:

- (1) technika chromatografii cienkowarstwowej dla próbek złożonych często zapewnia tylko rozdział grupowy;
- (2) tryb dwuwymiarowy (2D TLC-LC-MS) może powodować lepszy rozdział badanych związków, niż tryb jednowymiarowy (1D TLC-MS).

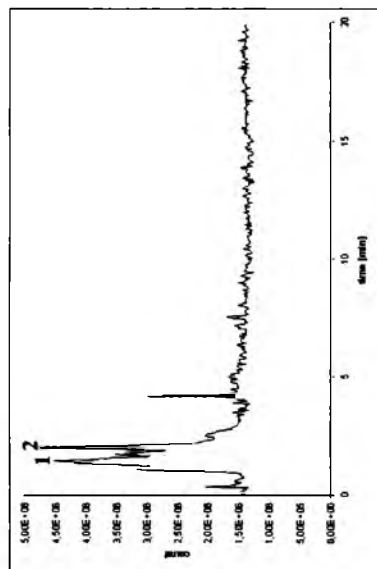
Należy także dodać, że mimo zastosowania techniki ESI-MS, która jest uważana za łagodny i zachowawczy sposób jonizacji, widma masowe uzyskane zarówno w trybie TLC-MS, jak i TLC-LC-MS są stosunkowo złożone, a uzyskane sygnały jonów molekularnych charakteryzują się niską intensywnością. Jednym z powodów uzyskania takich widm masowych może być bardzo złożony skład ekstraktów zawierających kwasy fenolowe i flawonoidy. Nie można jednak wykluczyć, że wyodrębnione związki fenolowe pod wpływem wielu czynników zewnętrznych (takich, jak np. światło, temperatura oraz wpływ fazy stacjonarnej i ruchomej, ale również i tryb jonizacji) mogą częściowo ulegać transformacji i/lub zniszczeniu struktury cząsteczki, co prowadzi do fragmentacji, widocznej na wszystkich zarejestrowanych widmach masowych.

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty stanowią kolejny krok zmierzający w kierunku konstrukcji charakterystycznych fingerprintów złożonych mieszanin związków szczególnie tych pochodzenia roślinnego, z wykorzystaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrią masową.

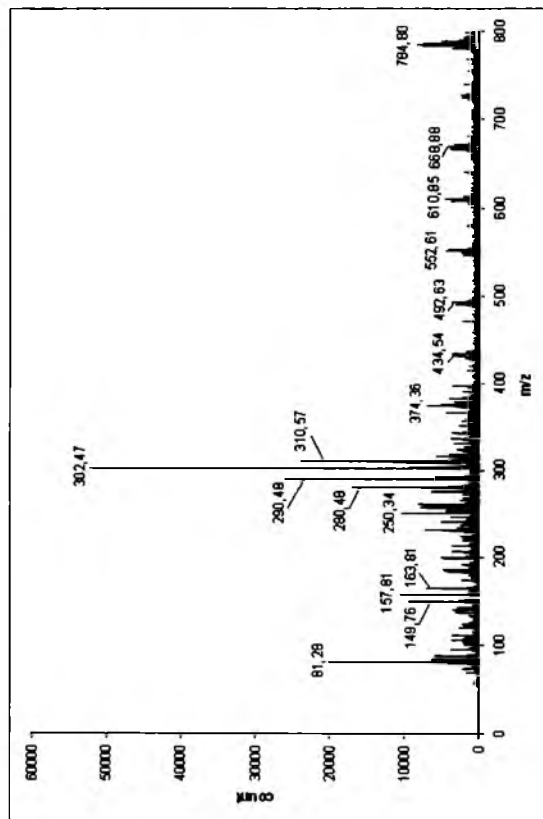
Należy wyraźnie zaznaczyć, że celem przeprowadzonych badań nie była identyfikacja chromatograficznie rozdzielonych składników ekstraktów roślinnych techniką spektrometrii masowej, ale konstrukcja nowego rodzaju fingerprintów.

Na uwagę zasługuje również nowatorski pomysł prowadzenia analizy w wariancie dwuwymiarowym, opartym na zastosowaniu interfejsu TLC-MS, który zapewnia poprawę rozdziału chromatograficznego, a zatem zwiększenie możliwości identyfikacji rozdzielonych składników złożonych mieszanin.

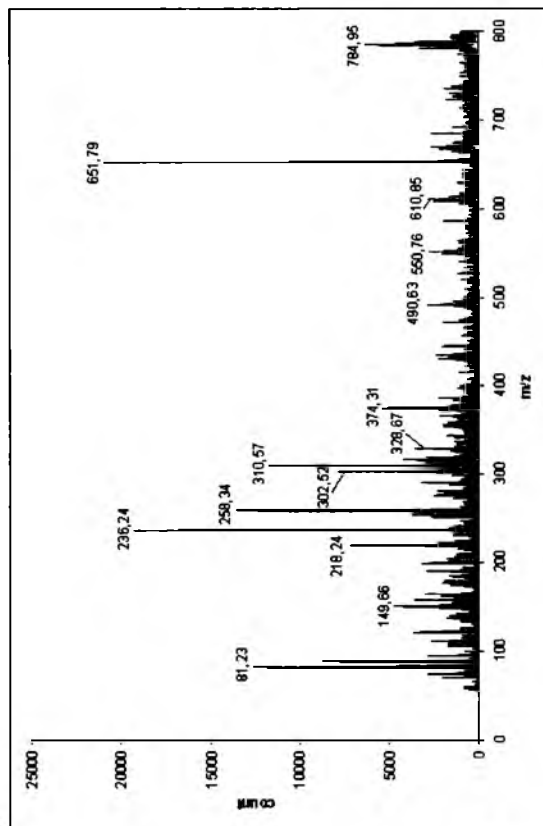
Na koniec należy również wspomnieć, iż widma masowe uzyskane w trybie dwuwymiarowym (2D TLC-LC-MS) są znacznie bardziej złożone niż te otrzymane w trybie jednowymiarowym, jednak po zastosowaniu metod chemometrycznych mogą one dodatkowo posłużyć do identyfikacji i kontroli jakości produktów pochodzenia naturalnego.



a)

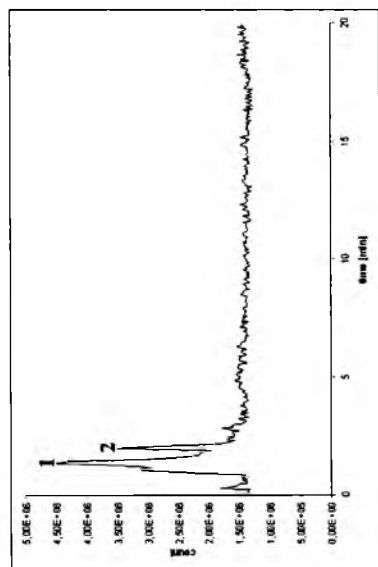


b)

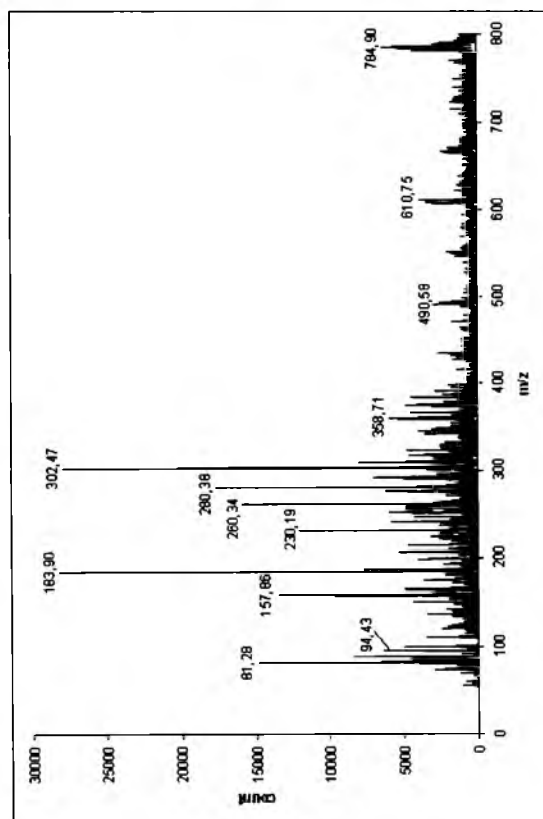


c)

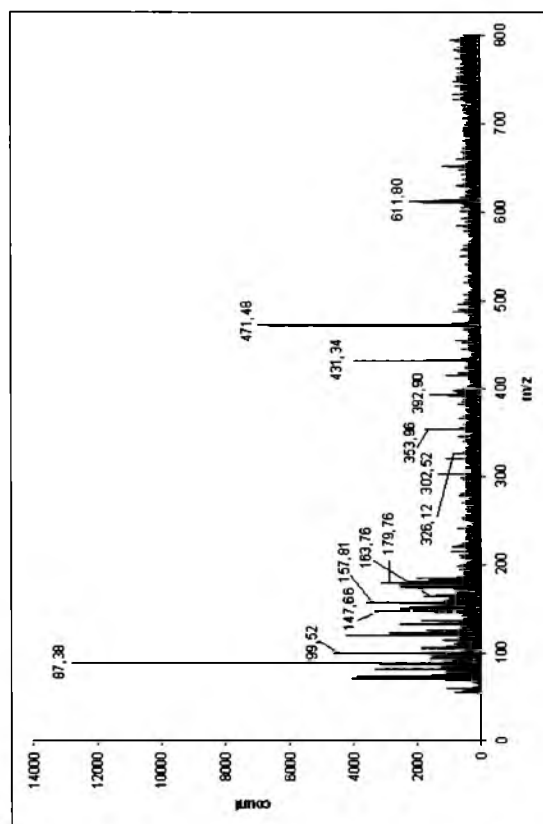
Rys. 55. a) Chromatogram cieczerw zarejestrowany dla pasma 1 (Rys. 53) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczerwego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C jonizacja pozytywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.



a)

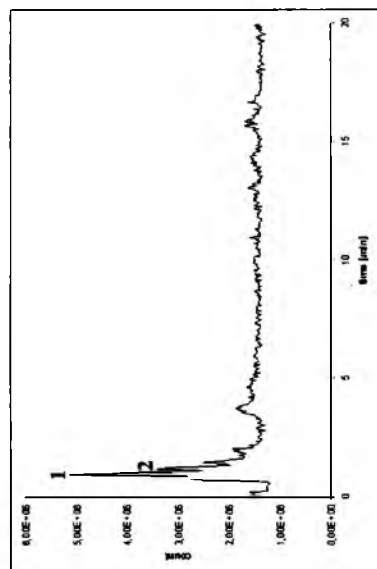


b)

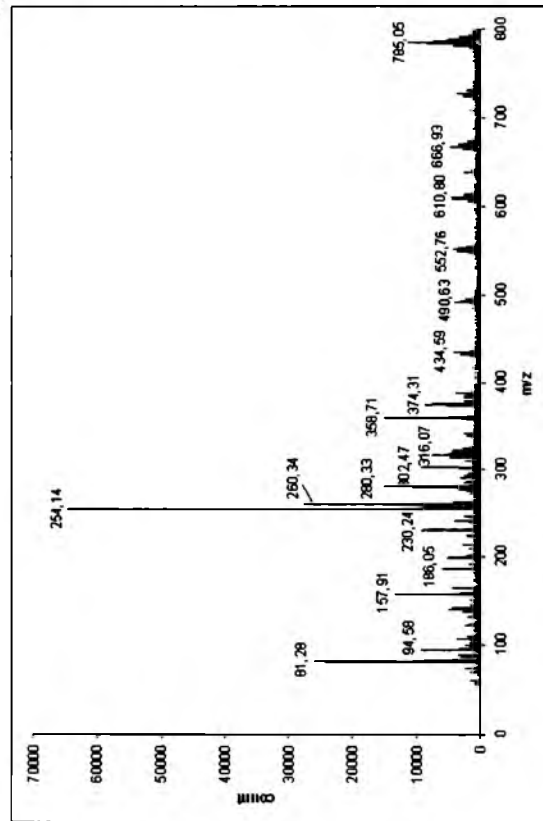


c)

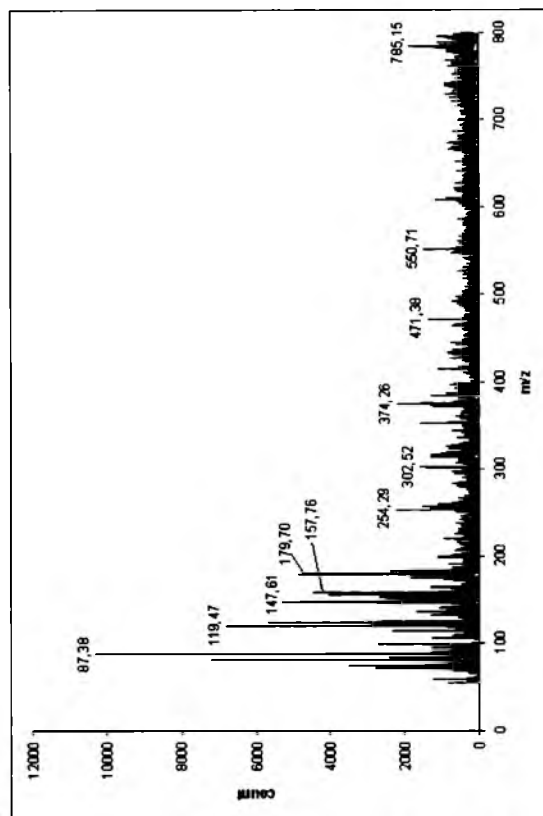
Rys. 56. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 2 (Rys. 53) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C jonizacja pozytywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.



a)

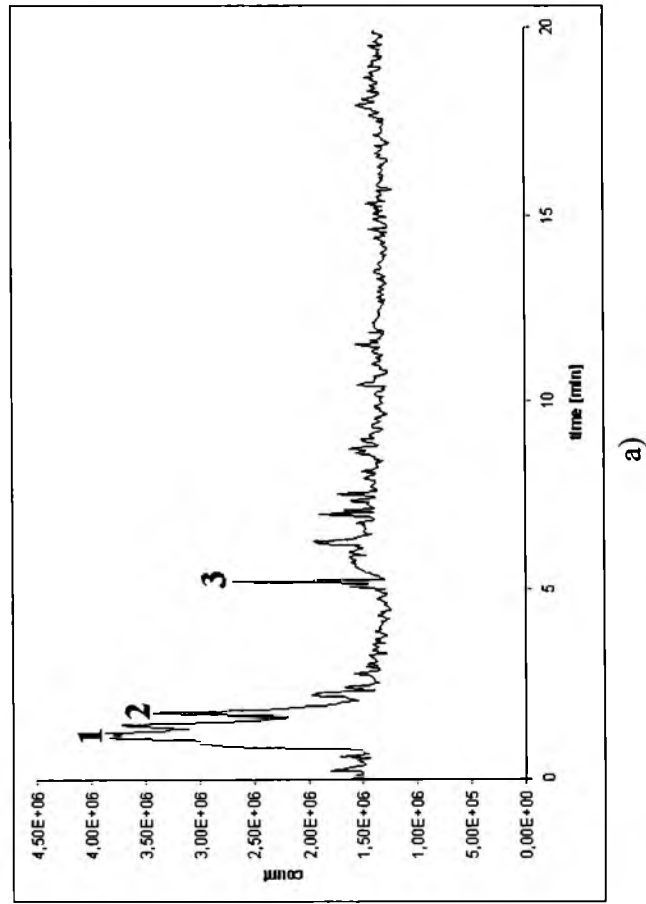


b)

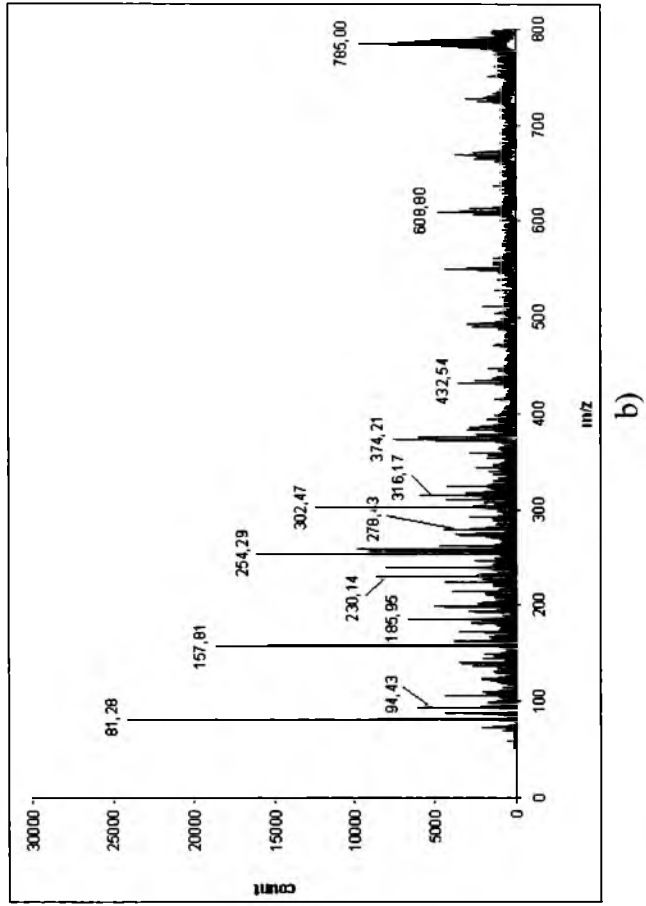


c)

Rys. 57. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 3 (Rys. 53) uzyskanego techniką chromatografii cienkowarstwowej i wprowadzonego do chromatografu cieczowego z detektorem spektrometrii mas (2D TLC-LC-MS); b) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 1; c) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C jonizacja pozytywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.

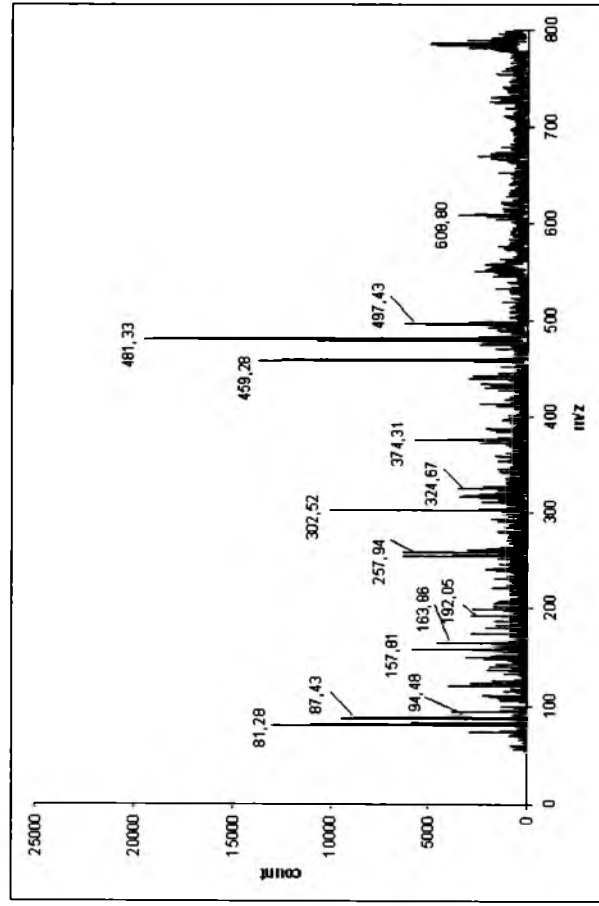


a)

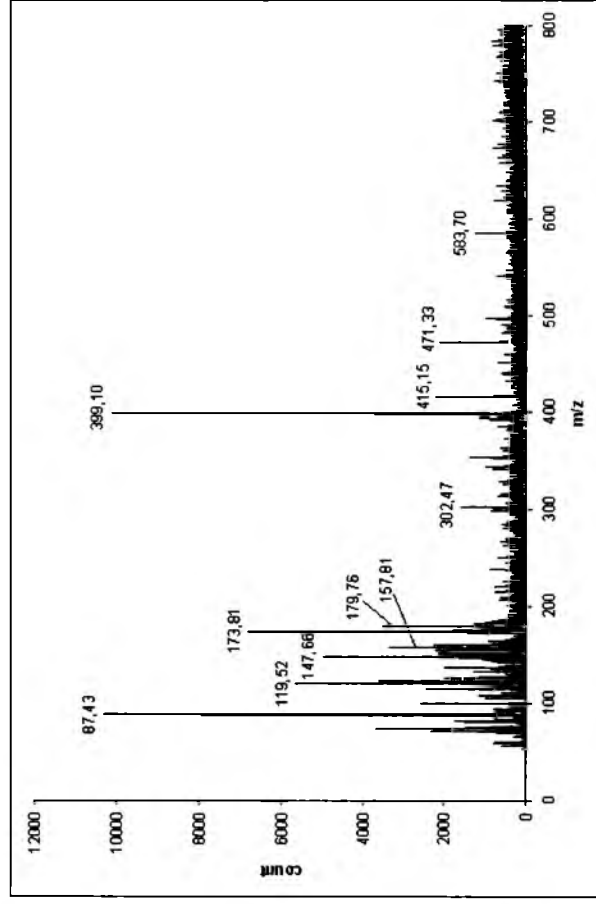


b)

Rys. 58. a) Chromatogram cieczowy zarejestrowany dla pasma 4 (Rys. 53) wyodrębnionego w układzie chromatografii cienkowarstwowej połączonej z chromatografem cieczowym z detektorem spektrometrii mas (TLC-LC-MS 2D); b) widmo masowe zarejestrowane dla pików 1; (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C jonizacja pozytywna; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.



c)



d)

Rys. 58 (c.d.) c) Widmo masowe zarejestrowane dla piksu 2; d) widmo masowe zarejestrowane dla piksu 3; (spektrometr mas Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XR8-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol + kwas octowy, 99,5:0,5 (v/v); szybkość przepływu fazy ruchomej 0,20 ml/min, czas analizy: 20 minut). ESI-MS, temperatura komory jonizacyjnej 45°C; napięcie 25Pa; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 80 V; szybkość przepływu fazy ruchomej 0,2 ml/min.

4.4. Chromatograficzna i chemometryczna analiza ekstraktów szalwii uzyskanych metodą selektywnej ekstrakcji flawonoidów

Mimo ogromnej liczby roślin należących do rodzaju *Salvia* i ich popularności, dotychczas poświęcono stosunkowo niewiele uwagi ich analizie fitochemicznej. Dopiero w niniejszej pracy przeprowadzono systematyczne badania wybranej, dość dużej grupy różnych gatunków szalwii. Przez wiele stuleci zyskały one na znaczeniu ze względu na swoje wybitne walory terapeutyczne, kulinarne i dekoracyjne, jednakże oficjalnie medycyna europejska dopuszcza tylko jeden gatunek szalwii, a mianowicie szalwię lekarską (*S. officinalis*) do powszechnego stosowania.

Dobrze znanym faktem jest to, iż za lecznicze właściwości wielu roślin odpowiedzialne są zawarte w nich pewne grupy związków, do których należą m.in. flawonoidy. Związki te głównie oddziałują z wolnymi rodnikami, choć wykazują także szereg innych właściwości terapeutycznych.

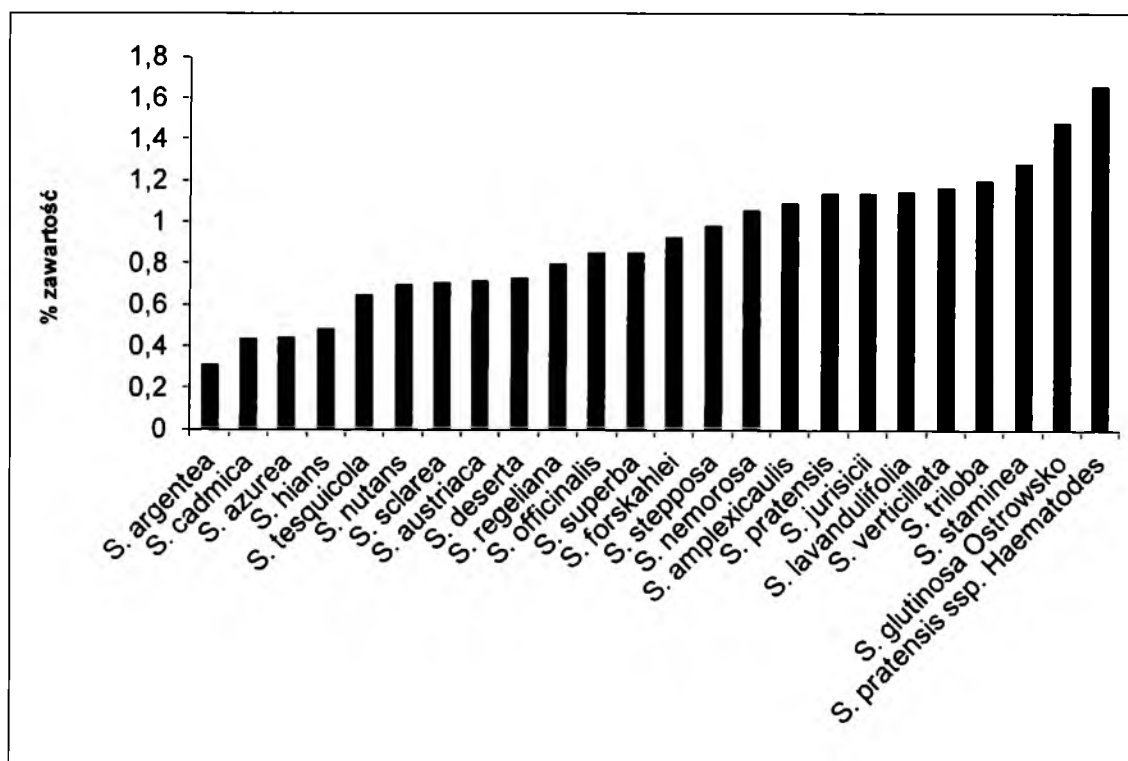
Zatem jasnym staje się wybór badanych gatunków szalwii, popularnie występujących na terenie środkowej i południowej Europy, jak również wybór analizy ich frakcji flawonoidowych. Istotnym celem tej pracy było m.in. wskazanie tych gatunków szalwii, które mogą konkurować pod względem wysokiej zawartości flawonoidów z szalwią lekarską. Posiadane przez nas ogólne informacje o badanym materiale roślinnym zamieszczono w tabeli 30. Chcąc osiągnąć postawiony cel badawczy, przeprowadzono spektrofotometryczne oznaczenie sumy zawartości flawonoidów w ekstraktach badanych gatunków szalwii, które otrzymano na drodze selektywnej ekstrakcji według procedur farmakopealnych. Wyniki oznaczeń spektrofotometrycznych przedstawiono graficznie w postaci diagramu słupkowego na rysunku 59. Ta wstępna analiza umożliwiła wyselekcjonowanie spośród wszystkich badanych próbek tych o największej procentowej zawartości flawonoidów. Ponadto przeprowadzono analizę chromatograficzną, która pierwotnie miała na celu potwierdzenie wyników otrzymanych metodą spektrofotometryczną, jednakże wyniki uzyskane techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej nie w pełni potwierdziły te otrzymane w spektrofotometrycznym oznaczeniu. Źródła rozbieżności między tymi dwiema odrębnymi analizami są omówione w dalszej części tego rozdziału, a dodatkowo w oparciu o chromatogramy HPLC/DAD frakcji flawonoidowych, przeprowadzono analizę porównawczą wszystkich badanych gatunków szalwii wykorzystując do tego celu metodę analizy czynników głównych (PCA). Przeprowadzona chemometryczna analiza danych pozwoliła na wyciągnięcie pewnych wniosków odnośnie do efektu sezonowości w składzie frakcji flawonoidowej poszczególnych gatunków szalwii.

Tab. 30. Wykaz gatunków szalwii poddanych analizie oraz ich okresy wegetacyjne

Nr	Gatunek szalwii	Rok zbioru	Nr	Gatunek szalwii	Rok zbioru
1	<i>S. amplexicaulis</i>	2007, 2008, 2009	15	<i>S. triloba</i>	2007, 2008, 2009
2	<i>S. azurea</i>	2007, 2008, 2009	16	<i>S. verticillata</i>	2007, 2008, 2009
3	<i>S. cadmica</i>	2007, 2008, 2009	17	<i>S. officinalis</i>	2007, 2008, 2009
4	<i>S. deserta</i>	2007, 2008, 2009	18	<i>S. lavandulifolia</i>	2007, 2009
5	<i>S. forskahlei</i>	2007, 2008, 2009	19	<i>S. atropatana</i>	2007
6	<i>S. glutinosa</i> ^a	2007, 2008, 2009	20	<i>S. canariensis</i>	2007
7	<i>S. hians</i>	2007, 2008, 2009	21	<i>S. argentea</i>	2008, 2009
8	<i>S. jurisicii</i>	2007, 2008, 2009	22	<i>S. austriaca</i>	2008, 2009
9	<i>S. nemorosa</i>	2007, 2008, 2009	23	<i>S. nutans</i>	2008, 2009
10	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	2007, 2008, 2009	24	<i>S. regeliana</i>	2008, 2009
11	<i>S. sclarea</i>	2007, 2008, 2009	25	<i>S. superba</i>	2008, 2009
12	<i>S. staminea</i>	2007, 2008, 2009	26	<i>S. glutinosa</i>	2008
13	<i>S. stepposa</i>	2007, 2008, 2009	27	<i>S. officinalis</i> ^b	2008
14	<i>S. tesquicola</i>	2007, 2008, 2009	28	<i>S. pratensis</i>	2009

^a ze stanowiska naturalnego w Ostrowsku, Polska

^b ze stanowiska naturalnego w Zlatiborze, Serbia



Rys. 59. Porównanie procentowej zawartości związków flawonoidowych w przeliczeniu na suchą masę materiału roślinnego w 24 gatunkach szalwii zebranych w 2009 roku, w oparciu o wyniki uzyskane techniką spektrofotometryczną.

Porównując chromatogramy selektywnie wyekstrahowanej frakcji flawonoidowej otrzymane techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC/DAD) dwudziestu czterech ekstraktów różnych gatunków szalwii zebranych w 2009 roku stwierdzono, że gatunkiem o największej ilości rozdzielonych pików (14 pików) i jednocześnie o ich największej sumarycznej powierzchni (1244 mAV×min) jest *S. nemorosa*. Porównując wzmankowane chromatogramy ze względu na sumaryczną wysokość rozdzielonych pików zaobserwowano, iż ten sam gatunek osiągnął również jedną z wyższych wartości sumarycznej wysokości pików (1893,5 mAV). W przeciwieństwie do gatunku *S. nemorosa*, chromatogram ekstraktu dla gatunku *S. cadmica* charakteryzuje się stosunkowo najmniejszą ilością rozdzielonych pików (4 piki), a jednocześnie ich sumaryczna powierzchnia i wysokość osiągnęły jedne z najniższych wartości wynosząc odpowiednio 630,4 mAV×min oraz 1507,7 mAV. W oparciu o otrzymane wyniki spośród dwudziestu czterech gatunków szalwii wybrano pięć o największej sumarycznej powierzchni i/lub wysokości rozdzielonych pików. Tymi gatunkami są: *S. amplexicaulis*, *S. azurea*, *S. forskahlei*, *S. hians* oraz *S. nemorosa*. Gatunkami o najmniejszej sumarycznej powierzchni i/lub wysokości rozdzielonych pików okazały się: *S. cadmica*, *S. nutans*, *S. officinalis*, *S. regeliana* oraz *S. triloba*. Ilość rozdzielonych pików oraz sumaryczne wartości powierzchni i wysokości pików dla dwudziestu czterech gatunków szalwii zamieszczono w tabeli 31.

Na rysunku 60a zaprezentowano fingerprinty (w postaci chromatogramów zarejestrowanych techniką HPLC/DAD) czterech gatunków szalwii o najwyższych sumarycznych wartościach powierzchni pików oraz fingerprint ekstraktu szalwii lekarskiej (*S. officinalis*). Chromatogram *S. officinalis* zamieszczono na rysunku w celach porównawczych pomimo, iż sumaryczny procent flawonoidów w niej zawartych osiągnął jedną z niższych wartości. Wpływ na ten wybór miała uprzywilejowana pozycja *S. officinalis* w medycynie tradycyjnej na terenie Europy.

Opierając się na wspomnianych wcześniej wynikach analizy spektrofotometrycznej (Rys. 59.) wskazano cztery gatunki jako te o największej sumarycznej procentowej zawartości flawonoidów, a mianowicie *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa*, *S. staminea* oraz *S. triloba* i porównano je z fingerprintami chromatograficznymi dla tych gatunków oraz dla *S. officinalis* (Rys. 60b). Uzyskany dla ekstraktu *S. officinalis* chromatogram w pełni potwierdził wyniki analizy spektrofotometrycznej, gdyż charakteryzuje się on stosunkowo niewielką liczbą rozdzielonych pików (6 pików), jak również ich niewielką sumaryczną powierzchnią (676,1 mAV×min) oraz najmniejszą sumaryczną wysokością (1377,4 mAV).

Salvia triloba jest takim gatunkiem szalwii, który w analizie spektrofotometrycznej wykazał jedną z wyższych procentowych zawartości flawonoidów, jednak na chromatogramie dla tego gatunku zaobserwowano jedynie 7 rozdzielonych pików a ich sumaryczna powierzchnia i wysokość są stosunkowo niewielkie. Niemniej jednak wartości te są większe od wartości uzyskanych dla gatunku *S. officinalis*.

Z kolei analiza spektrofotometryczna przeprowadzona dla *S. staminea* wykazała, że jest ona gatunkiem o wyższej zawartości procentowej flawonoidów zarówno w stosunku do *S. officinalis*, jak również w stosunku do *S. triloba*, co znajduje bezpośrednie potwierdzenie w wynikach uzyskanych techniką HPLC/DAD. Wprawdzie na chromatogramie uzyskanym dla *S. staminea* odnotowano jedynie 9 rozdzielonych pików jednak ich sumaryczne wartości powierzchni i wysokości są największe spośród pięciu analizowanych gatunków.

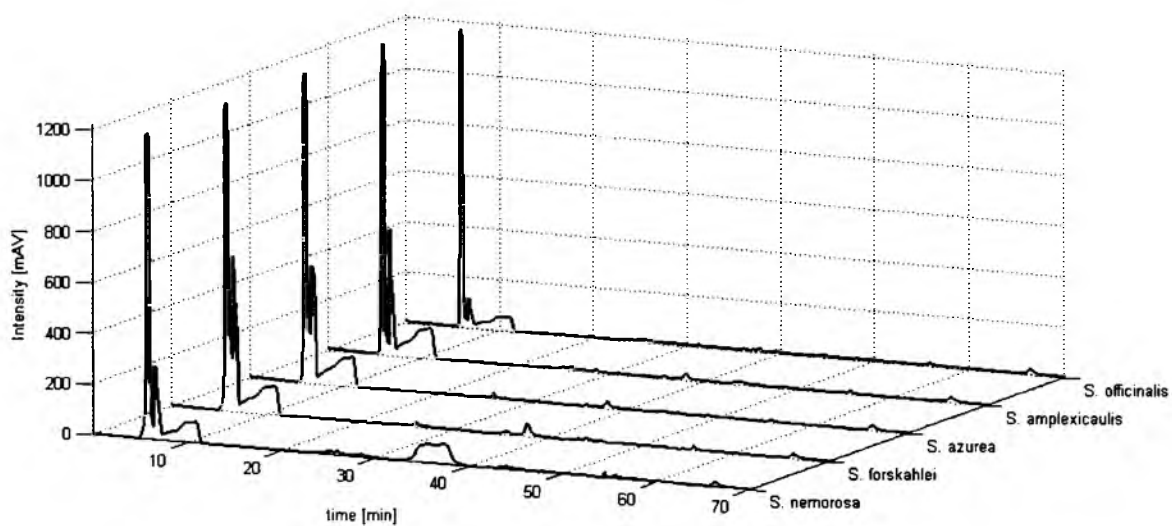
Salvia glutinosa jest tym gatunkiem, który wykazał wyższą zawartość procentową flawonoidów (analiza spektrofotometryczna) od trzech wcześniej wymienionych gatunków szalwii, jednakże analiza chromatograficzna nie potwierdziła w pełni tych wyników, bowiem na chromatogramie zaobserwowano tylko 8 rozdzielonych pików, których sumaryczna powierzchnia i wysokość wynosiły odpowiednio 895,8 mAV×min oraz 1630,3 mAV. Wartości te były niższe względem wartości uzyskanych dla gatunku *S. staminea*, ale wyższe od wartości otrzymanych dla gatunków *S. officinalis* oraz *S. triloba*.

Ostatnim analizowanym gatunkiem o największej procentowej zawartości flawonoidów (analiza spektrofotometryczna) jest *S. pratensis* ssp. *Haematodes*. Na chromatogramie stwierdzono obecność 12 rozdzielonych pików, tj. najwięcej spośród pięciu porównywanych gatunków szalwii. Ich sumaryczna powierzchnia i wysokość wynosiły odpowiednio 903,4 mAV×min oraz 1635,5 mAV.

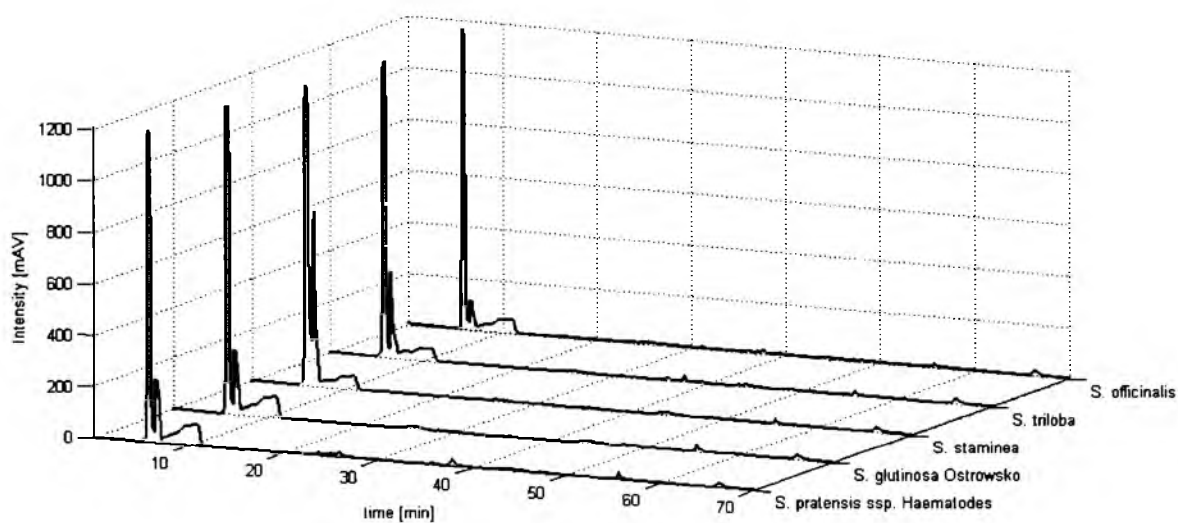
Tab. 31. Porównanie liczby rozdzielonych pików oraz ich sumarycznej wysokości i powierzchni dla 24 gatunków szalwii zebranych w 2009 roku. Numery ekstraktów octanowych są zgodne z numeracją podaną w tabeli 28.

Nr	Gatunek szalwii	Liczba rozdzielonych pików	Sumaryczna wysokość rozdzielonych pików [mAV]	Sumaryczna powierzchnia rozdzielonych pików [mAV×min]
1	<i>S. amplexicaulis</i>	7	1906,3	1038,2
2	<i>S. azurea</i>	6	1856,3	1168,3
3	<i>S. cadmica</i>	4	1507,7	630,4
4	<i>S. deserta</i>	6	1666,3	740,8
5	<i>S. forskahlei</i>	8	2041,6	1238,3
6	<i>S. glutinosa</i> ^a	8	1630,3	895,8
7	<i>S. hians</i>	11	1951,7	1009,0
8	<i>S. jurisicii</i>	13	1643,7	847,0
9	<i>S. nemorosa</i>	14	1893,5	1244,0
10	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	12	1635,5	903,4
11	<i>S. sclarea</i>	5	1610,7	852,3
12	<i>S. staminea</i>	9	1980,8	948,0
13	<i>S. stepposa</i>	9	1646,1	632,3
14	<i>S. tesquicola</i>	9	1665,8	667,4
15	<i>S. triloba</i>	7	1586,4	669,4
16	<i>S. verticillata</i>	7	1711,7	878,8
17	<i>S. officinalis</i>	6	1377,4	676,1
18	<i>S. lavandulifolia</i>	9	1614,3	837,4
21	<i>S. argentea</i>	9	1634,1	981,5
22	<i>S. austriaca</i>	8	1561,0	930,0
23	<i>S. nutans</i>	7	1464,7	609,4
24	<i>S. regeliana</i>	7	1487,9	806,6
25	<i>S. superba</i>	6	1993,5	886,4
28	<i>S. pratensis</i>	9	1600,7	927,6

^a ze stanowiska naturalnego w Ostrowsku, Polska



a)



b)

Rys. 60. a) Porównanie chromatogramów HPLC/DAD pięciu gatunków szalwii, które (z wyjątkiem *S. officinalis*) posiadają największą sumę powierzchni pików chromatograficznych (*S. nemorosa*, *S. forskahlei*, *S. azurea*, *S. amplexicaulis* and *S. officinalis*). b) Porównanie chromatogramów HPLC/DAD pięciu gatunków szalwii, które (z wyjątkiem *S. officinalis*) posiadają największą, oznaczoną spektrofotometrycznie sumę zawartości związków flawonoidowych (*S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa*, *S. staminea*, *S. triloba*. and *S. officinalis*) Chromatogramy a i b zarejestrowano przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm.

Powodem rozbieżności między wynikami uzyskanymi spektrofotometrycznie, a wynikami uzyskanymi techniką HPLC/DAD jest przede wszystkim różna czułość, a także różny charakter mierzonych wielkości przy pomocy zastosowanych metod pomiarowych. Analiza spektrofotometryczna opierała się na pomiarze absorbancji ekstraktu przy długości fali świetlnej $\lambda = 425$ nm, i następnie na tej podstawie obliczano sumaryczną procentową zawartość flawonoidów w przeliczeniu na hiperozyd. Ponadto należy podkreślić, że na podstawie przeprowadzonych eksperymentów okazało się, że procedura spektrofotometrycznego oznaczania zarówno kwasów fenolowych, jak i flawonoidów nie jest doskonała (rozdz. 4.1.). Dodatkowy powód rozbieżności mogły stanowić inne niż flawonoidy substancje pochodzenia roślinnego zawarte w analizowanych próbkach szalwii, które zostały wyodrębnione razem z flawonoidami mimo zastosowania selektywnej ekstrakcji, a których obecność zafałszowała sumaryczny wynik oceny spektrofotometrycznej. Tymczasem analiza chromatograficzna techniką HPLC/DAD opiera się na rozdziale mieszaniny związków na pojedyncze indywidua chemiczne, a ponadto technika ta charakteryzuje się zdecydowanie większą czułością od techniki spektrofotometrycznej. Zatem podsumowując, różnice wynikające z charakteru przeprowadzonych pomiarów z pewnością wynikają z różnych źródeł powstawania błędów.

Uzyskany w niniejszych badaniach zbiór chromatogramów HPLC/DAD zarejestrowanych dla wybranych gatunków szalwii dla trzech okresów wegetacyjnych (lata 2007-2009) poddano również analizie chemometrycznej. Analizowane chromatogramy były traktowane jako odciski palca, co oznacza, iż w toku analizy chemometrycznej nie identyfikowano poszczególnych pików, a chromatogram był traktowany jako całość, która w unikalny sposób charakteryzuje daną próbkę. W pierwszym kroku analizy chemometrycznej polepszano stosunek sygnału do szumu w porównywanych chromatogramach z zastosowaniem metody PALS. Zmniejszono także wpływ szumu na sygnał przez zastosowanie filtru Savitzky'ego-Golay'a. Dla wszystkich analizowanych odcisków palca przyjęto parametr kary w metodzie PALS jako 10^7 , a dla filtru Savitzky'ego-Golay'a przyjęto okno o szerokości równej 51. Na rysunku 61 pokazano linie bazowe wybranych chromatogramów oraz sygnały zarówno przed, jak i po usunięciu szumu oraz linii bazowej. Ostatnim krokiem wstępnego przygotowania danych do analizy było zastosowanie transformacji SNV.

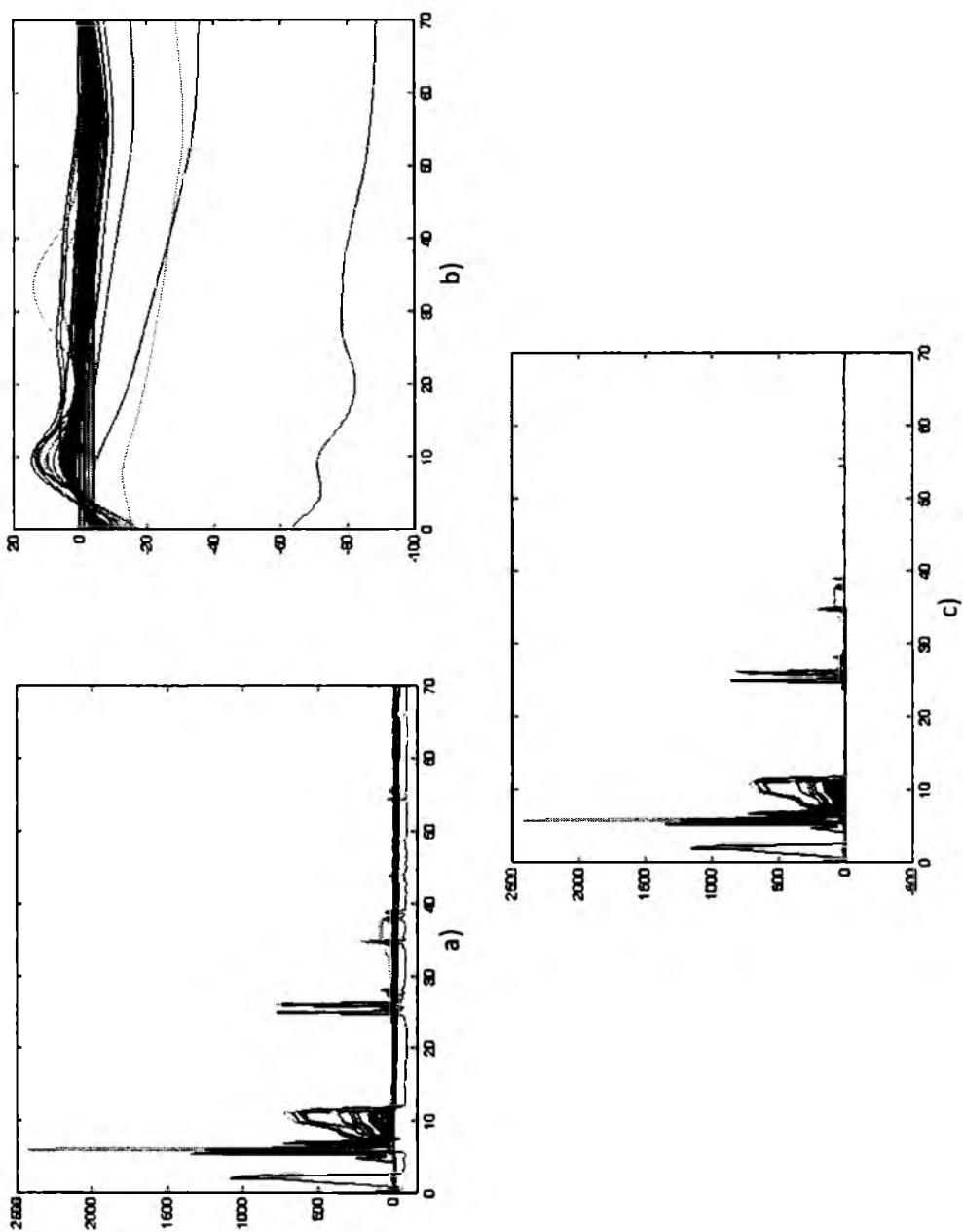
Na projekcjach obiektów na płaszczyzny wybranych czynników głównych przedstawionych na rysunku 62, widoczne są trzy grupy gatunków szalwii. Bez trudu można zauważyć, iż na obszarze pierwszego czynnika głównego PC1, który opisuje blisko 70% wariancji danych, próbki szalwii zebrane w 2007 roku różnią się od reszty (Rys. 63). Rezultat ten osiągnięto przez zastosowanie metody DPLS [113], co poprzedziło podział wszystkich próbek na zbiór modelowy oraz testowy przy zastosowaniu algorytmu Kennarda i Stone'a [114]. Algorytm ten umożliwia przypisanie do zbioru modelowego, a więc służącego do konstrukcji modelu i odpowiedzialnego za jego moc predykcyjną, próbek reprezentujących wszystkie rodzaje wariancji w danych. Zbiór modelowy zawierał po 17 próbek z dwóch grup. Grupę pierwszą stanowiły próbki z roku 2007, a grupę drugą próbki z lat 2008 i 2009. Do zbioru testowego odpowiedzialnego za sprawdzenie mocy predykcyjnej modelu, przypisano pozostałe próbki. Z uwagi na ograniczoną liczbę próbek, została zastosowana procedura walidacji krzyżowej typu „wyrzucić 3 obiekty”, celem określenia optymalnej kompleksowości konstruowanego modelu DPLS. Optymalna kompleksowość konstruowanego modelu DPLS dla tych danych wyniosła 3 czynniki ukryte (Rys. 64). Do oceny dopasowania modelu do danych oraz mocy predykcyjnej skonstruowanego modelu DPLS zastosowano parametr CCR, czyli procent poprawnie sklasyfikowanych

przez model próbek z niezależnego zbioru testowego, a ponadto obliczono selektywność oraz specyficzność (Tab. 32). Otrzymano następującą wartość parametru CCR = 84,38% dla próbek z niezależnego zbioru testowego. Oczywiście pożądany byłby wyższy wynik, jednakże otrzymany wynik jest satysfakcjonujący, kiedy ma się na uwadze, iż odnosi się on do modelu konstruowanego dla próbek pochodzenia biologicznego, a więc próbek cechujących się złożonością i różnorodnością składu chemicznego.

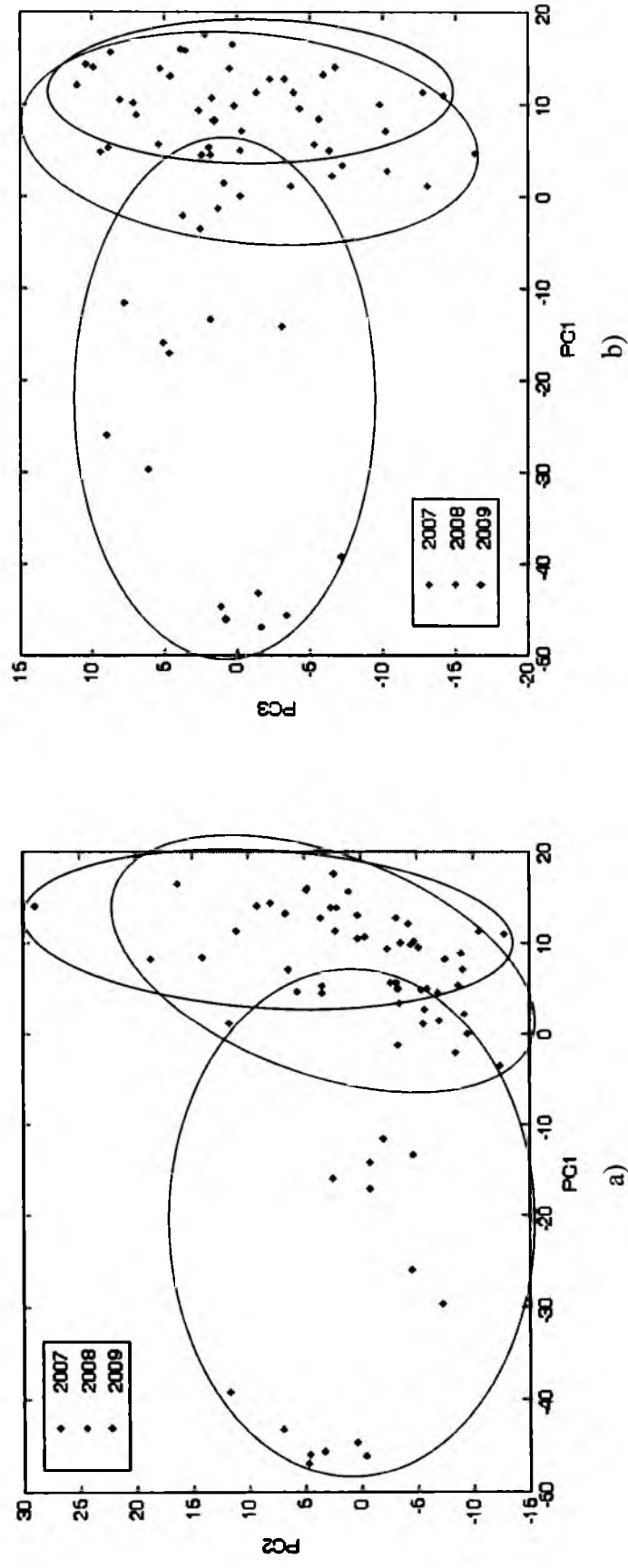
Tab. 32. Parametry modelu DPLS (SE – czułość, SP – specyficzność, CCR – procent poprawnie sklasyfikowanych próbek odpowiednio dla zbioru modelowego i testowego).

	Zbiór modelowy	Zbiór testowy
SE	94,18	88,00
SP	100	71,43
CCR	97,06	84,38

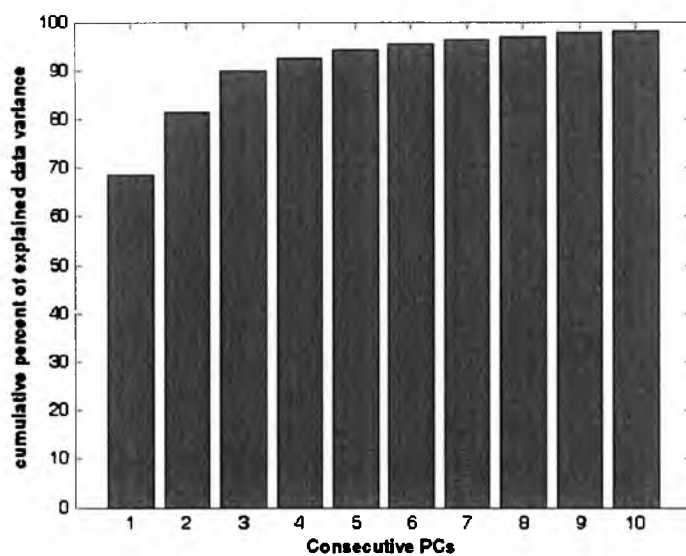
Podsumowując, analiza spektrofotometryczna 24 ekstraktów różnych gatunków szalwii zebranych w 2009 roku miała na celu międzygatunkowe porównanie procentowej zawartości flawonoidów oraz wyselekcjonowanie spośród badanych gatunków tych o największej zawartości, co bezsprzecznie udało się osiągnąć. Mimo pewnych rozbieżności między wynikami uzyskanymi spektrofotometrycznie a wynikami uzyskanymi techniką HPLC/DAD, chromatogramy pięciu wybranych gatunków szalwii potwierdziły słuszność wyników otrzymanych podczas analizy spektrofotometrycznej. Na podstawie wstępnych wyników, prezentowanych w niniejszej pracy wydaje się, iż wszystkie z czterech wybranych na podstawie analizy spektrofotometrycznej gatunki szalwii, tj. *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa*, *S. staminea* oraz *S. triloba* mogą z powodzeniem konkurować z *S. officinalis* pod względem właściwości terapeutycznych, szczególnie takich, które są związane ze znaczącą zawartością flawonoidów w materiale roślinnym. Przydatność posługiwania się fingerprintami sporządzonych ekstraktów poddanych analizie chemometrycznej została potwierdzona przez konstrukcje modeli matematycznych, które umożliwiły rozróżnienie sezonów zbioru badanych gatunków szalwii.



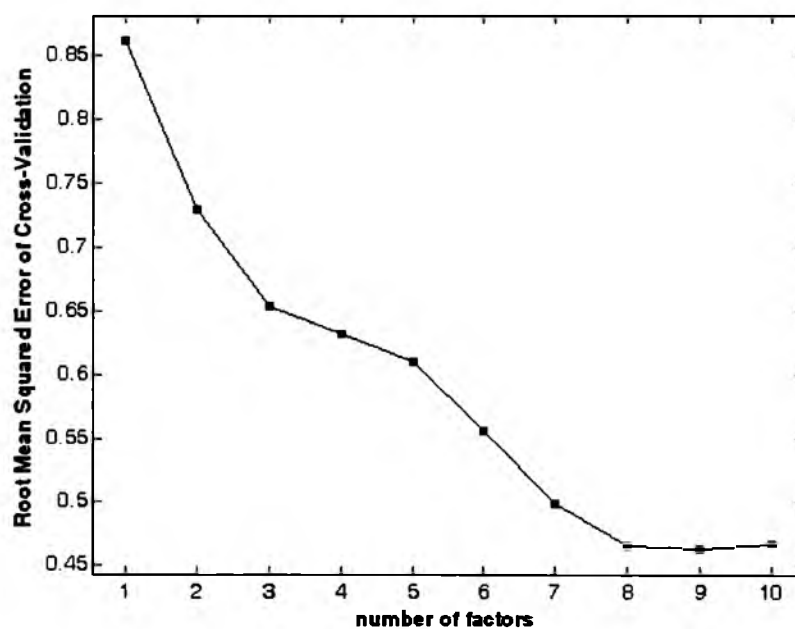
Rys. 61. Profile HPLC/DAD 26 gatunków szatwii zebranych w latach od 2007 do 2009. a) Chromatogramy przed usunięciem linii bazowej; b) usunięta linia bazowa; c) chromatogramy po usunięciu linii bazowej.



Rys. 62. Projekcje obiektów na płaszczyzny zdefiniowane przez a) pierwszy i drugi oraz b) pierwszy i trzeci czynnik główny.



Rys. 63. Skumulowany procent wariancji danych opisany przez kolejne czynniki główne.



Rys. 64. Wyniki krzyżowej walidacji przeprowadzonej w celu określenia optymalnej kompleksowości konstruowanego modelu DPLS.

5. Chromatograficzna i chemometryczna analiza ekstraktów szalwii uzyskanych metodą wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych

Celem przedstawionych w tym rozdziale badań było wykazanie, iż analiza spektrofotometryczna jest niewystarczająca do oznaczenia z odpowiednią dokładnością zawartości związków fenolowych w materiale roślinnym. Dodatkowe badania z wykorzystaniem innych technik analitycznych, takich, jak chromatografia cienkowarstwowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa z różnym rodzajem detekcji miały na celu potwierdzenie i uzupełnienie wyników analizy spektrofotometrycznej. Ponadto wyniki uzyskane technikami chromatograficznymi umożliwiły kompleksowe porównanie badanych gatunków ziół z rodzaju *Salvia* i co bezpośrednio za tym idzie, pozwoliły na wytypowanie gatunków o największej zawartości związków biologicznie czynnych, tj. związków fenolowych. Takie podejście analityczne może w przyszłości umożliwić użycie wybranych gatunków szalwii do celów kulinarnych, a nawet leczniczych.

W pierwszym etapie badań dwadzieścia trzy gatunki szalwii zebrane w 2009 roku poddano dwóm osobnym procedurom selektywnej ekstrakcji, otrzymując w ten sposób ekstrakty zawierające kwasy fenolowe i flawonoidy. Kolejnym krokiem była analiza spektrofotometryczna otrzymanych ekstraktów, która miała na celu oznaczenie procentowej sumarycznej zawartości zarówno kwasów fenolowych, jak i flawonoidów. Wyniki tej analizy wraz z obliczonymi wartościami odchylenia standardowego umieszczono w tabeli 33. Oprócz tego przedstawiono je graficznie przy pomocy diagramów zamieszczonych na rysunkach 65 a i b. Na podstawie otrzymanych wyników wytypowano sześć gatunków szalwii o największej procentowej zawartości kwasów fenolowych, (tj. *S. sclarea*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. verticillata*, *S. azurea* i *S. cadmica*) oraz pięć gatunków o największej procentowej zawartości flawonoidów (*S. staminea*, *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa*, *S. verticillata* i *S. triloba*). Stwierdzono, że wyniki otrzymane dla szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) są nieco zaskakujące, gdyż są one relatywnie niskie, jak na jedyny gatunek należący do tego rodzaju, który jest stosowany w medycynie europejskiej. Mimo to, ten szczególnie gatunek poddano kolejnym etapom badań, głównie w celach porównawczych.

Wstępna selektywna ekstrakcja, a następnie analiza spektrofotometryczna uzyskanych ekstraktów umożliwiła wybór gatunków roślin o największej zawartości związków fenolowych. Jednak spektrofotometryczna ocena zawartości tych związków była stosunkowo powierzchowna, gdyż zarówno kwasy fenolowe, jak i flawonoidy występują w materiale roślinnym nie tylko jako wolne substancje, ale także w różnych formach związanych. Dlatego kolejnym krokiem analitycznym było zastosowanie wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych dla wybranych na podstawie wyników analizy spektrofotometrycznej gatunków szalwii. Ostatecznie w tym procesie uzyskano sześć różnych frakcji dla każdego z dziesięciu badanych gatunków szalwii, które następnie poddano analizie techniką chromatografii cienkowarstwowej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Chromatografia cienkowarstwowa jest jedyną techniką chromatograficzną, która umożliwia prezentację uzyskanych wyników w postaci obrazów. Rozdział wieloskładnikowych ekstraktów roślinnych pozwala na otrzymanie chromatogramów, które można uznać za fingerprinty, gdyż zgodnie z definicją fingerprintu może nim być również chromatogram reprezentujący cechy chemiczne badanej próbki [182].

Większość opublikowanych metod tworzenia fingerprintów opiera się na pojedynczym chromatogramie [183-186], jednak dzięki zastosowaniu wielostopniowej ekstrakcji (schemat tej ekstrakcji przedstawiono na rysunku 66 a i b) uzyskano po sześć różnych frakcji dla każdego z dziesięciu badanych gatunków ziół, co w prostym rachunku

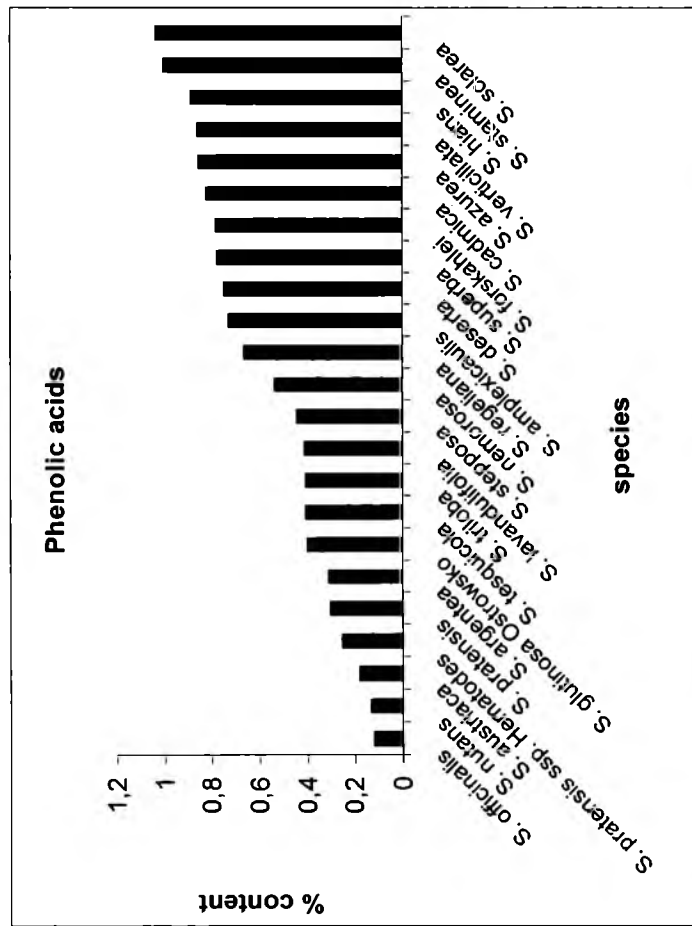
daje sześćdziesiąt chromatogramów, które stanowią podstawę do ustalenia zarówno podobieństw, jak i różnic wśród porównywanych gatunków roślin.

Celem wykazania przydatności zastosowanej wielostopniowej ekstrakcji związków fenolowych na rysunkach 67 – 72 umieszczono chromatogramy dziesięciu badanych gatunków szaławii.

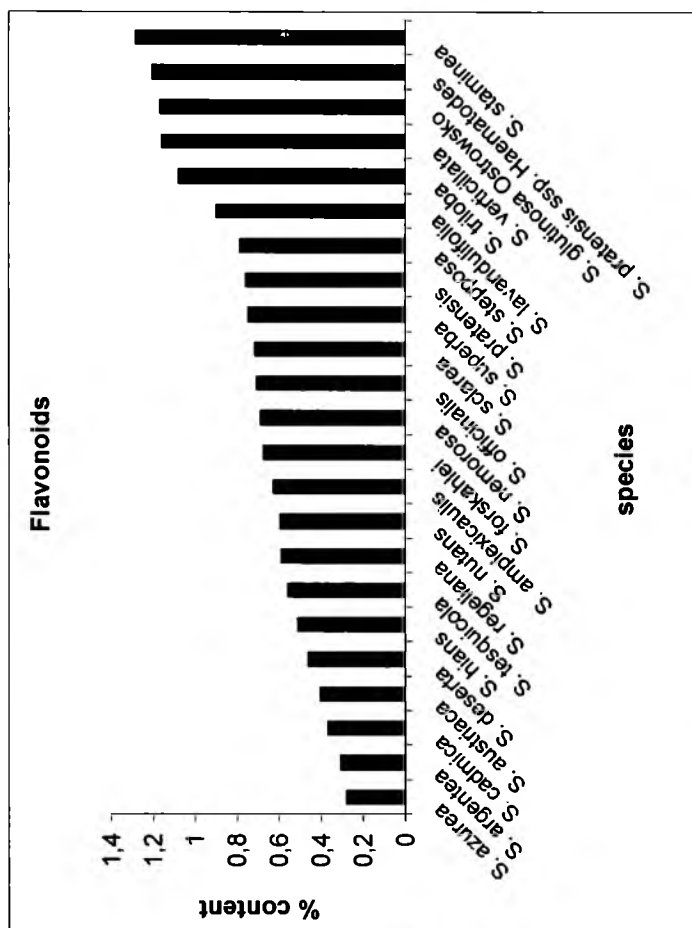
Analizując wszystkie uzyskane chromatogramy stwierdzono, iż rejestracja chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm umożliwia detekcję większej ilości pasm w porównaniu z chromatogramami zarejestrowanymi przy długości fali świetlnej $\lambda = 254$ nm. Biorąc pod uwagę te obserwacje, w niniejszym rozdziale skupiono się na porównaniu i omówieniu uzyskanych wyników dotyczących jedynie chromatogramów zarejestrowanych przy długości fali świetlnej $\lambda = 366$ nm. Dodatkowo na chromatogramach frakcji WKF i AF dla niektórych gatunków szaławii stwierdzono obecność czerwonych pasm, których nie wliczano do sumarycznej ilości rozdzielonych pasm oraz nie wzięto pod uwagę w omówieniu wyników, gdyż z dużym prawdopodobieństwem pochodzą one od chlorofilu. Ponadto porównując chromatogramy wszystkich frakcji uzyskanych w wyniku przeprowadzenia wielostopniowej ekstrakcji stwierdzono, że różnią się one między sobą zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, jednak to przede wszystkim różny skład chemiczny tych frakcji świadczy o selektywności ekstrakcji wybranej do tego eksperymentu. Trafnie wybrana metoda ekstrakcji umożliwiła konstrukcję oraz kompleksową analizę zestawu osiemnastu różnych fingerprintów dla każdego z dziesięciu badanych gatunków szaławii, tj. sześciu chromatogramów uzyskanych techniką chromatografii cienkowsarstwowej oraz po sześć chromatogramów uzyskanych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej odpowiednio z detekcją DAD i ELSD.

Tab. 33. Sumaryczna procentowa zawartość kwasów fenolowych i flawonoidów dla 23 gatunków szaławii zebranych w 2009 roku

Nr	Gatunek szaławii	Sumaryczna zawartość kwasów fenolowych [%] ± RSD [%]	Sumaryczna zawartość flawonoidów [%] ± RSD [%]
1	<i>S. amplexicaulis</i>	0,730 ± 0,032	0,629 ± 0,150
2	<i>S. argentea</i>	0,311 ± 0,035	0,308 ± 0,001
3	<i>S. austriaca</i>	0,182 ± 0,016	0,403 ± 0,343
4	<i>S. azurea</i>	0,853 ± 0,143	0,277 ± 0,178
5	<i>S. cadmica</i>	0,821 ± 0,123	0,367 ± 0,074
6	<i>S. deserta</i>	0,749 ± 0,019	0,462 ± 0,286
7	<i>S. forskahlei</i>	0,781 ± 0,077	0,675 ± 0,275
8	<i>S. glutinosa</i>	0,399 ± 0,072	1,166 ± 0,341
9	<i>S. hians</i>	0,885 ± 0,133	0,510 ± 0,028
10	<i>S. lavandulifolia</i>	0,412 ± 0,050	0,900 ± 0,264
11	<i>S. nemorosa</i>	0,537 ± 0,107	0,689 ± 0,401
12	<i>S. nutans</i>	0,132 ± 0,027	0,595 ± 0,108
13	<i>S. pratensis</i>	0,302 ± 0,012	0,760 ± 0,411
14	<i>S. pratensis ssp. Haematodes</i>	0,255 ± 0,018	1,204 ± 0,495
15	<i>S. regeliana</i>	0,666 ± 0,049	0,589 ± 0,223
16	<i>S. sclarea</i>	1,034 ± 0,092	0,716 ± 0,012
17	<i>S. staminea</i>	1,001 ± 0,026	1,286 ± 0,020
18	<i>S. stepposa</i>	0,443 ± 0,018	0,784 ± 0,215
19	<i>S. superba</i>	0,779 ± 0,082	0,748 ± 0,113
20	<i>S. tesquicola</i>	0,406 ± 0,022	0,557 ± 0,099
21	<i>S. triloba</i>	0,406 ± 0,032	1,078 ± 0,132
22	<i>S. verticillata</i>	0,856 ± 0,120	1,160 ± 0,001
23	<i>S. officinalis</i>	0,122 ± 0,009	0,708 ± 0,151

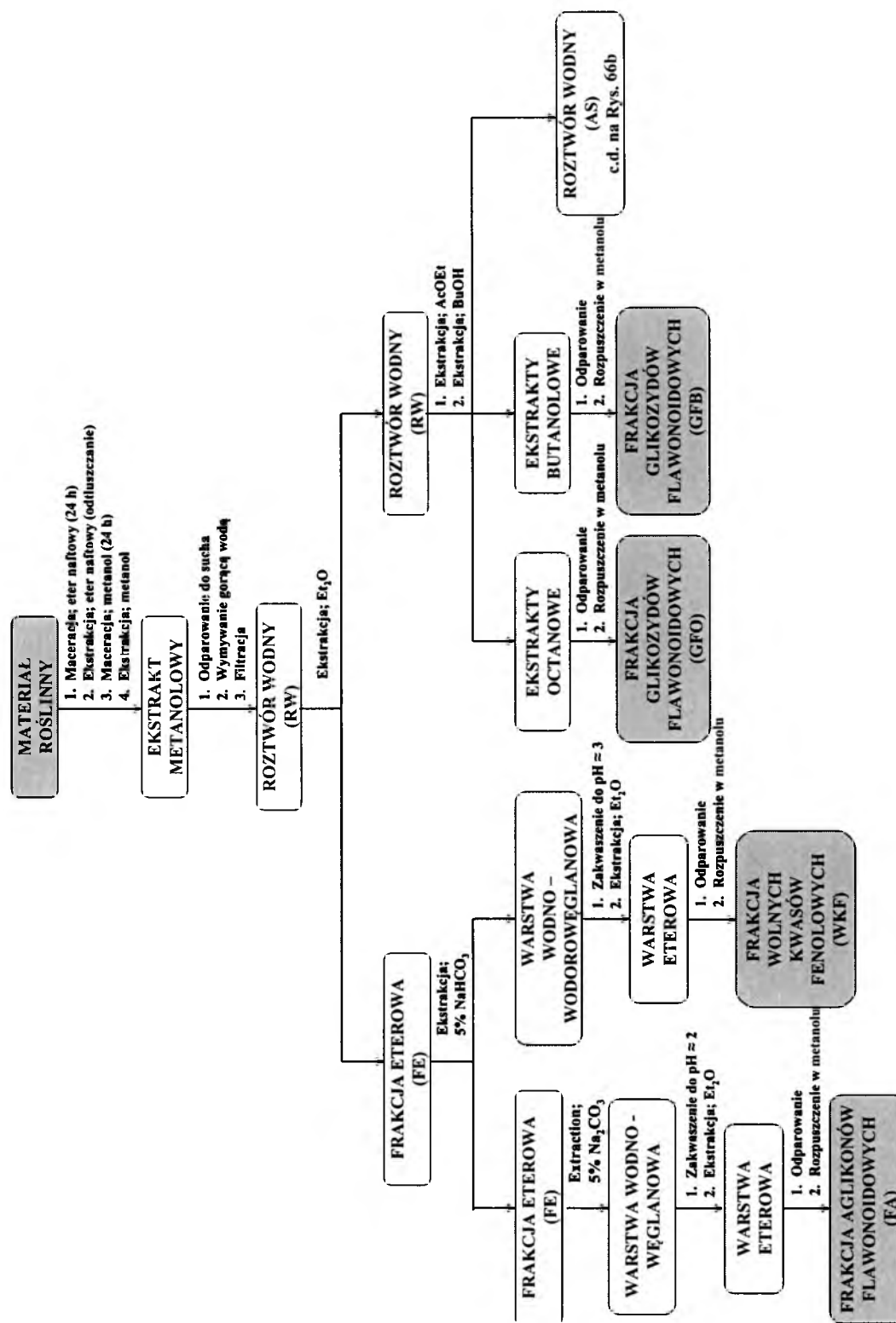


a)

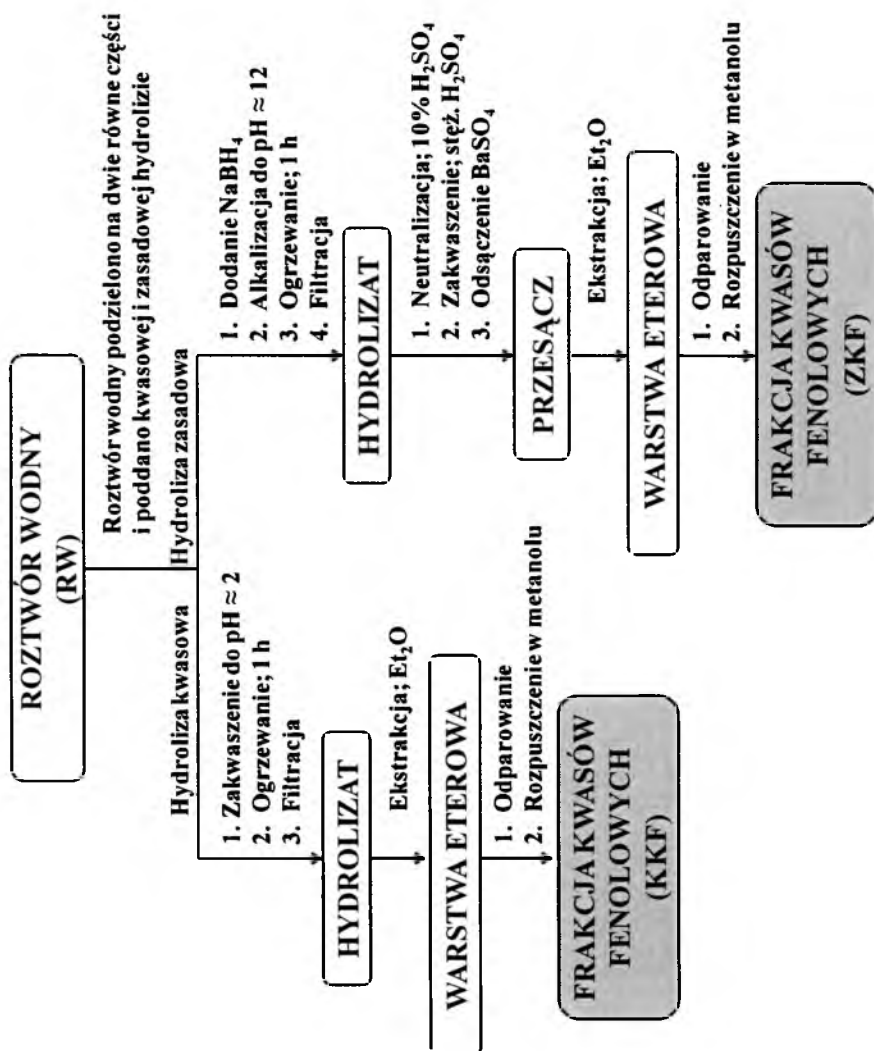


b)

Rys. 65. Porównanie procentowej zawartości a) kwasów fenolowych oraz b) flawonoidów w przeliczeniu na suchą masę roślin w dwudziestu trzech gatunkach szalwii zebranych w 2009 roku, w oparciu o wyniki uzyskane podczas analizy spektrofotometrycznej.



Rys. 66a. Schemat ekstrakcji związków fenolowych wybranych gatunków szatwii.



Rys. 66b. Schemat hydrolizy kwasowej i hydrolizy zasadowej kwasów fenolowych w ekstraktach wybranych gatunków szalwii.

W pierwszej kolejności analizie poddano chromatogramy uzyskane techniką chromatografii cienkowarstwowej. Na podstawie otrzymanych wyników podjęto próby wyboru gatunków najbogatszych w związki fenolowe spośród sześciu badanych frakcji, tj. **WKF** – wolnych kwasów fenolowych, **KKF** – kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej, **ZKF** – kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej, **AF** – aglikonów flawonoidowych, **GFO** – niepolarnych glikozydów flawonoidowych i **GFB** – polarnych glikozydów flawonoidowych, każdorazowo kierując się barwą, ilością oraz intensywnością rozdzielonych pasm.

Jako pierwsze porównano chromatogramy frakcji wolnych kwasów fenolowych (**WKF**). Analizując otrzymane chromatogramy (Rys. 67.) zaobserwowano, iż trzy stosunkowo najbardziej intensywne pasma zidentyfikowano we wszystkich badanych gatunkach szalwii i mogą one zostać uznane za markery chemotaksonomiczne dla wszystkich gatunków. Na rysunku 67 pasma te zaznaczono czerwonymi strzałkami. Wśród trzech występujących we wszystkich badanych gatunkach szalwii pasm, dla tych o najniższej wartości współczynnika retardacji R_F , stwierdzono ich najmniejszą intensywność na chromatogramach oznaczonych numerami 6 i 9, należącymi odpowiednio do gatunków *S. azurea* i *S. glutinosa*.

Najwięcej charakterystycznych pasm dla każdego z badanych gatunków ziół zaobserwowano przy najniższych i najwyższych wartościach współczynnika retardacji R_F , co zaznaczono na chromatogramach różowymi klamrami. Dodatkowo dla gatunku *S. officinalis* stwierdzono obecność jednego charakterystycznego pasma, jednak wszystkie te pasma cechują się stosunkowo niewielką intensywnością, zatem zawartość wskazanych substancji w analizowanym materiale roślinnym jest stosunkowo niewielka, co bezpośrednio przekłada się na ich terapeutyczne działanie. Niemniej jednak obecność tych substancji jest szczególnie ważna z chemotaksonomicznego punktu widzenia, gdyż umożliwiają one konstrukcję charakterystycznych fingerprintów, a co bezpośrednio za tym idzie, systematykę tych roślin właśnie ze względu na ich różnorodny skład chemiczny.

Najmniejszą ilość rozdzielonych pasm stwierdzono na chromatogramach oznaczonych numerami 1, 4, 6, i 9, należących odpowiednio do gatunków *S. sclarea*, *S. officinalis*, *S. azurea* oraz *S. glutinosa*. Dodatkowo ostatnie dwa z wymienionych gatunków cechują się również najmniejszą intensywnością tych pasm spośród dziesięciu badanych gatunków szalwii. Jednak gatunkiem o najniższej zawartości wolnych kwasów fenolowych jest *S. azurea*, bowiem tylko dla tej rośliny na chromatogramie nie zaobserwowano pozostałych na linii startu nie rozdzielonych substancji. Natomiast gatunkiem o największej ilości oraz intensywności rozdzielonych pasm jest *S. cadmica*, której chromatogram oznaczono numerem 7. Dla tego gatunku zaobserwowano także jedno charakterystyczne pasmo o stosunkowo znacznej intensywności.

Jako drugie w kolejności porównano chromatogramy frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej (**KKF**). Analizując otrzymane chromatogramy (Rys. 68.) stwierdzono obecność dwóch pasm występujących we wszystkich badanych gatunkach szalwii, które podobnie jak w przypadku frakcji wolnych kwasów fenolowych, mogą zostać uznane za markery chemotaksonomiczne. Najmniejszą intensywność pasm oznaczonych numerem II zaobserwowano na chromatogramach dla gatunków *S. sclarea* i *S. officinalis*. Z kolei dla pasm oznaczonych numerem III zauważono, iż gatunkiem o nieco mniejszej intensywności tego pasma jest *S. officinalis*, natomiast gatunkiem o najmniejszej jego intensywności jest *S. azurea*. Pozostałe gatunki szalwii wykazały podobną intensywność pasm oznaczonych zarówno numerem II, jak i numerem III. Ponadto zaobserwowano dwa

pasma występujące w większości omawianych ziół, z których te o najniższej wartości współczynnika retardacji R_F (oznaczone numerem I), widoczne są na chromatogramach oznaczonych numerami 2 – 5 i 7 – 9, należących odpowiednio do gatunków *S. staminea*, *S. hians*, *S. officinalis*, *S. verticillata*, *S. cadmica*, *S. pratensis ssp. Haematodes* oraz *S. glutinosa*. Największą intensywność tego pasma odnotowano dla gatunku *S. glutinosa*, natomiast najmniejszą intensywność dla gatunku *S. officinalis*. Drugim pasmem występującym na większości chromatogramów jest pasmo o najwyższej wartości współczynnika retardacji R_F (oznaczone numerem IV). Pasma te występują na chromatogramach wszystkich gatunków z wyjątkiem tych oznaczonych numerami 6 i 7, należących odpowiednio do gatunków *S. azurea* oraz *S. cadmica*.

Na chromatogramie gatunku *S. cadmica* widoczne są dwa, a dla gatunku *S. azurea* trzy charakterystyczne pasma, których obecności nie stwierdzono na chromatogramach pozostałych gatunków szalwii i z uwagi na to substancje te mogą zostać uznane za markery chemotaksonomiczne.

Gatunkami o najmniejszej ilości oraz intensywności rozdzielonych pasm są *S. sclarea*, *S. officinalis* oraz *S. triloba*, których chromatogramy oznaczono odpowiednio numerami 1, 4 i 10. Natomiast najwięcej rozdzielonych pasm zaobserwowano na chromatogramie oznaczonym numerem 5 należącym do gatunku *S. verticillata*, jednak większość z tych pasm cechuje się stosunkowo niewielką intensywnością. Zatem chcąc wybrać gatunek o największej zawartości kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej wybrano gatunek na którego chromatogramie widoczne było o jedno rozdzielone pasmo mniej, lecz za to widoczna była większa ilość pasm o stosunkowo dużej intensywności. Gatunkiem tym okazała się *S. hians*, oznaczona na chromatogramie numerem 3.

Jako trzecie w kolejności porównano chromatogramy frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej (ZKF). Analizując otrzymane chromatogramy (Rys. 69.) stwierdzono obecność jednego pasma występującego we wszystkich badanych gatunkach szalwii, które podobnie jak w przypadku dwóch poprzednich frakcji, mogą zostać uznane za markery chemotaksonomiczne. Najmniejszą intensywność pasm oznaczonych numerem I zaobserwowano na chromatogramach dla gatunków *S. azurea* i *S. pratensis ssp. Haematodes*. Ponadto zaobserwowano dwa pasma występujące w większości omawianych ziół, z których te oznaczone numerem II, widoczne są na chromatogramach oznaczonych numerami 1 – 6, 8 i 10, należących odpowiednio do gatunków *S. sclarea*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. officinalis*, *S. verticillata*, *S. azurea*, *S. pratensis ssp. Haematodes* oraz *S. triloba*. Najmniejszą intensywność tego pasma odnotowano ponownie dla gatunków *S. azurea* i *S. pratensis ssp. Haematodes*. Drugim pasmem występującym na większości chromatogramów jest pasmo o najwyższej wartości współczynnika retardacji (R_F) (oznaczone numerem III). Pasma te występują na chromatogramach wszystkich gatunków z wyjątkiem tych oznaczonych numerami 6, 7 i 9, należących odpowiednio do gatunków *S. azurea*, *S. cadmica* oraz *S. glutinosa*.

Na chromatogramie gatunku *S. hians* widoczne jest jedno, a dla gatunku *S. azurea* cztery charakterystyczne pasma, których obecności nie stwierdzono na chromatogramach pozostałych gatunków szalwii i z uwagi na to substancje te mogą zostać uznane za wskaźniki chemotaksonomiczne.

Gatunkami o najmniejszej ilości oraz intensywności rozdzielonych pasm są *S. cadmica*, *S. pratensis ssp. Haematodes* oraz *S. glutinosa* których chromatogramy oznaczono odpowiednio numerami 7 – 9. Natomiast najwięcej rozdzielonych pasm zaobserwowano na chromatogramie oznaczonym numerem 2 należącym do gatunku *S. staminea*.

Ponadto porównując trzy analizowane frakcje kwasów fenolowych stwierdzono, iż największą liczbę rozdzielonych pasm zaobserwowano na chromatogramach frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej (czyli kwasów fenolowych związanych estrowo), mniejszą liczbę dla frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej (czyli kwasów fenolowych związanych glikozydowo), a najmniejszą dla frakcji wolnych kwasów fenolowych.

Jako czwarte w kolejności porównano chromatogramy frakcji aglikonów flawonoidowych (AF). O ile porównując chromatogramy wcześniej omówionych frakcji wyznawano zasadę jak z dziecięcego quizu „porównaj rysunki i znajdź różniące się elementy” to w przypadku chromatogramów uzyskanych dla frakcji aglikonów flawonoidowych widoczne są one na pierwszy rzut oka (Rys. 70.). Nie stwierdzono obecności ani jednego pasma występującego we wszystkich lub w większości badanych gatunków szalwii, co oznacza, że każdy chromatogram jest charakterystyczny dla każdego gatunku szalwii.

Najmniejszą ilość i/lub intensywność rozdzielonych pasm zaobserwowano na chromatogramach dla gatunków *S. verticillata* oraz *S. triloba* których chromatogramy oznaczono odpowiednio numerami 5 i 6.. Z kolei gatunkiem o największej ilości oraz intensywności rozdzielonych pasm jest *S. cadmica* oznaczona numerem 10.

Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że mimo niskiej zawartości aglikonów flawonoidowych zawartych w badanej frakcji, stanowią one największą podstawę do zróżnicowania badanych gatunków roślin.

Jako przedostatnie porównano chromatogramy octanowej frakcji glikozydów flawonoidowych (GFO). Analizując otrzymane chromatogramy (Rys. 71.) stwierdzono obecność trzech pasm (oznaczonych numerami I, IV i V) występujących we wszystkich badanych gatunkach szalwii, które podobnie jak w przypadku innych frakcji, mogą zostać uznane za markery chemotaksonomiczne. Największą intensywność pasm oznaczonych numerem I zaobserwowano na chromatogramach dla gatunków *S. pratensis ssp. Haematodes* (2), *S. glutinosa* (3), *S. officinalis* (4) oraz *S. cadmica* (10). Z kolei dla pasm oznaczonych numerem IV zauważono, iż gatunkami o najmniejszej intensywności tego pasma są *S. officinalis* (4), *S. triloba* (6) i *S. azurea* (9). Natomiast pasma oznaczone numerem V charakteryzują się porównywalną intensywnością dla wszystkich dziesięciu gatunków szalwii. Pasma oznaczone numerem II nie jest widoczne na chromatogramach dla gatunków *S. staminea* (1), *S. verticillata* (5) oraz *S. azurea* (9). Natomiast dla gatunku *S. cadmica* (10) pasmo to wykazuje największą intensywność. Drugim pasmem występującym na większości chromatogramów jest pasmo oznaczone numerem III. Pasma to występuje na chromatogramach wszystkich gatunków z wyjątkiem *S. glutinosa* (3). Ponadto pasmo to wykazuje największą intensywność dla gatunków *S. staminea* (1) oraz *S. sclarea* (7).

Na chromatogramie gatunku *S. glutinosa* widoczne jest jedno charakterystyczne pasma, którego obecności nie stwierdzono na chromatogramach pozostałych gatunków szalwii i z uwagi na to substancja ta może zostać uznana za wskaźnik chemotaksonomiczny.

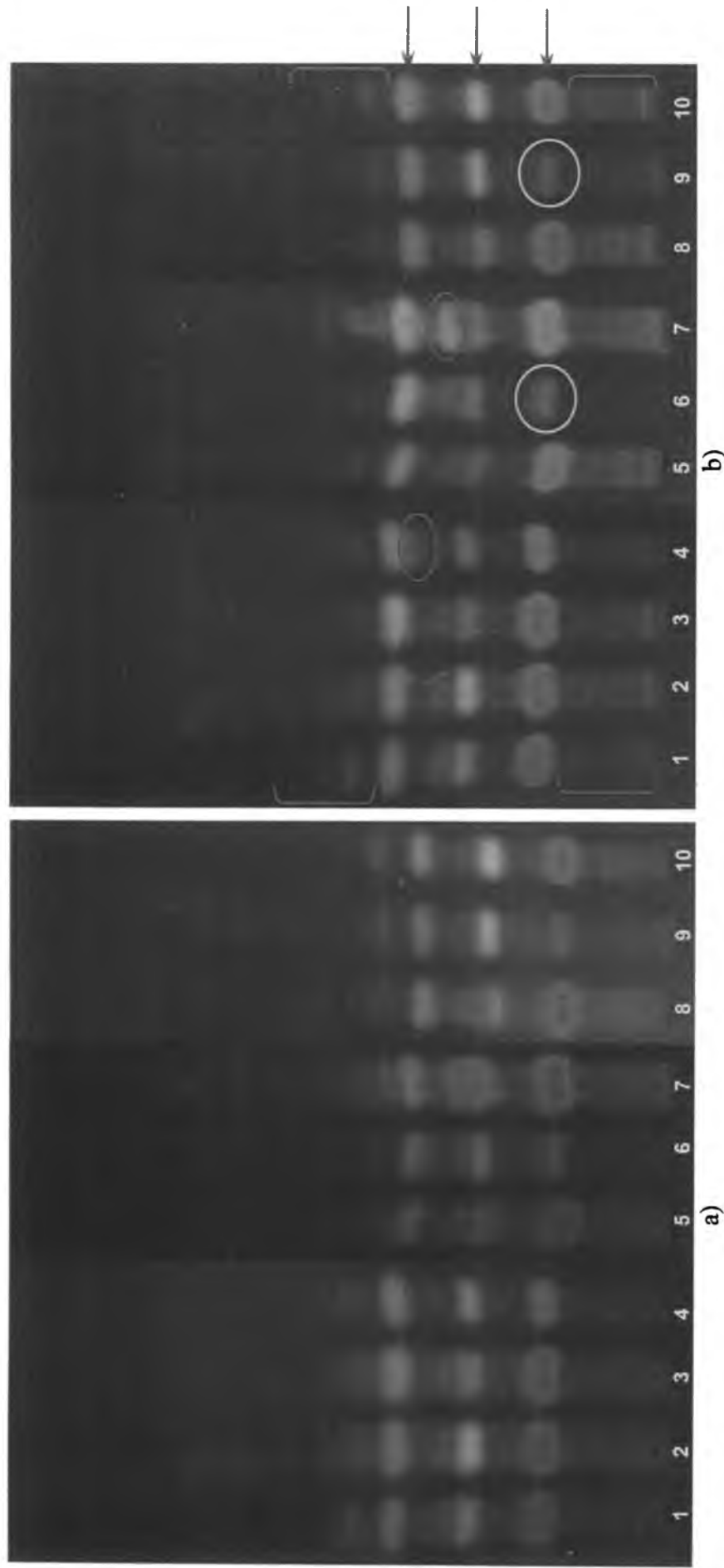
Gatunkiem o największej ilości oraz intensywności rozdzielonych pasm jest *S. sclarea*, której chromatogram oznaczono numerem 7.

Jako ostatnie porównano chromatogramy butanolowej frakcji glikozydów flawonoidowych (GFB). Analizując otrzymane chromatogramy (Rys. 72.) stwierdzono obecność dwóch pasm (oznaczonych numerami I i II) występujących we wszystkich badanych gatunkach szalwii, które mogą zostać uznane za markery

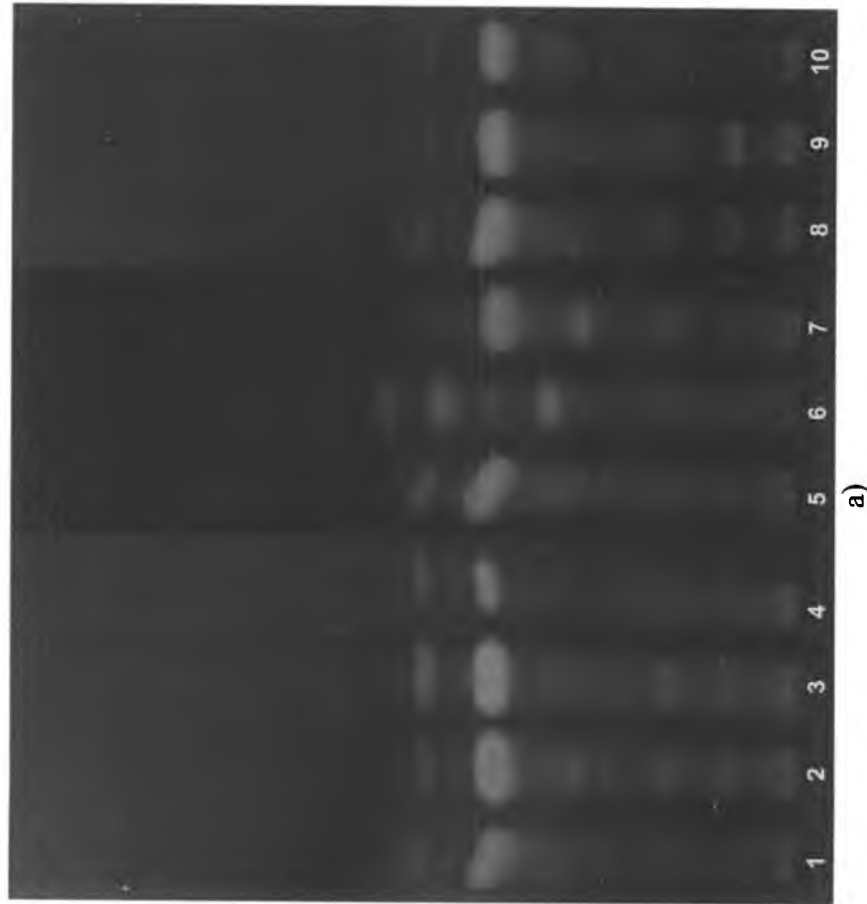
chemotaksonomiczne. Największą intensywność pasm oznaczonych numerem I zaobserwowano na chromatogramach dla gatunków *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa* oraz *S. officinalis*. Z kolei dla pasm oznaczonych numerem II zauważono, iż gatunkami o znacznie mniejszej intensywności tego pasma są *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. officinalis*, *S. triloba* oraz *S. sclarea*. Zaobserwowano również jedno pasmo występujące w większości omawianych ziół, oznaczone numerem III. Pasma to jest prawie nie widoczne na chromatogramach dla gatunków *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. officinalis* oraz *S. triloba*.

Na chromatogramach gatunków *S. pratensis* ssp. *Haematodes* oraz *S. cadmica* widoczne jest jedno, a dla gatunku *S. glutinosa* trzy charakterystyczne pasma, których obecności nie stwierdzono na chromatogramach pozostałych gatunków szalwii i z uwagi na to substancje te mogą zostać uznane za wskaźniki chemotaksonomiczne.

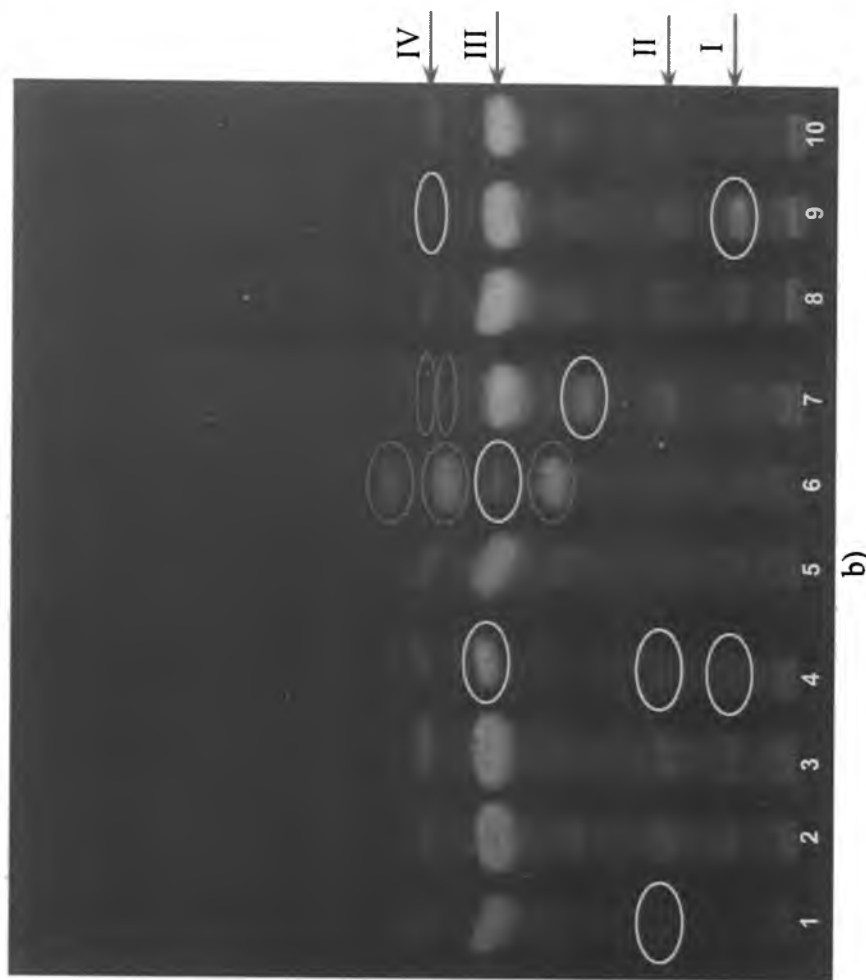
Gatunkami o największej ilości oraz intensywności rozdzielonych pasm są *S. cadmica*, *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa*, *S. hians* oraz *S. azurea*. Chcąc także znaleźć gatunek szalwii, którego skład chemiczny jest najbardziej zbliżony do *S. officinalis* porównano chromatogramy wszystkich frakcji. Stwierdzono, że dla wszystkich trzech frakcji zawierających kwasy fenolowe oraz dwóch frakcji glikozydów flawonoidowych takim gatunkiem jest *S. triloba*. Fingerprinty uzyskane dla tego gatunku wydają się być najbardziej zbliżone do profili chromatograficznych *S. officinalis*.



Rys. 67. Zdjęcia chromatogramów frakcji wolnych kwasów fenolowych (WKF) dziesięciu wybranych gatunków szawii: a) Chromatogramy przed wywołaniem, b) chromatogramy po wywołaniu. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: benzen + octan etylu + kwas mrówkowy, 6 : 3 : 1 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja zdjęć chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery umieszczone na chromatogramach odpowiadają poszczególnym gatunkom szawii: 1 – *S. sclarea*, 2 – *S. staminea*, 3 – *S. hians*, 4 – *S. officinalis*, 5 – *S. verticillata*, 6 – *S. azurea*, 7 – *S. cadmica*, 8 – *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, 9 – *S. glutinosa*, 10 – *S. triloba*. — pasma występujące we wszystkich lub w większości badanych gatunków szawii, pasma różniące się intensywnością, — pasma charakterystyczne dla badanych gatunków szawii.

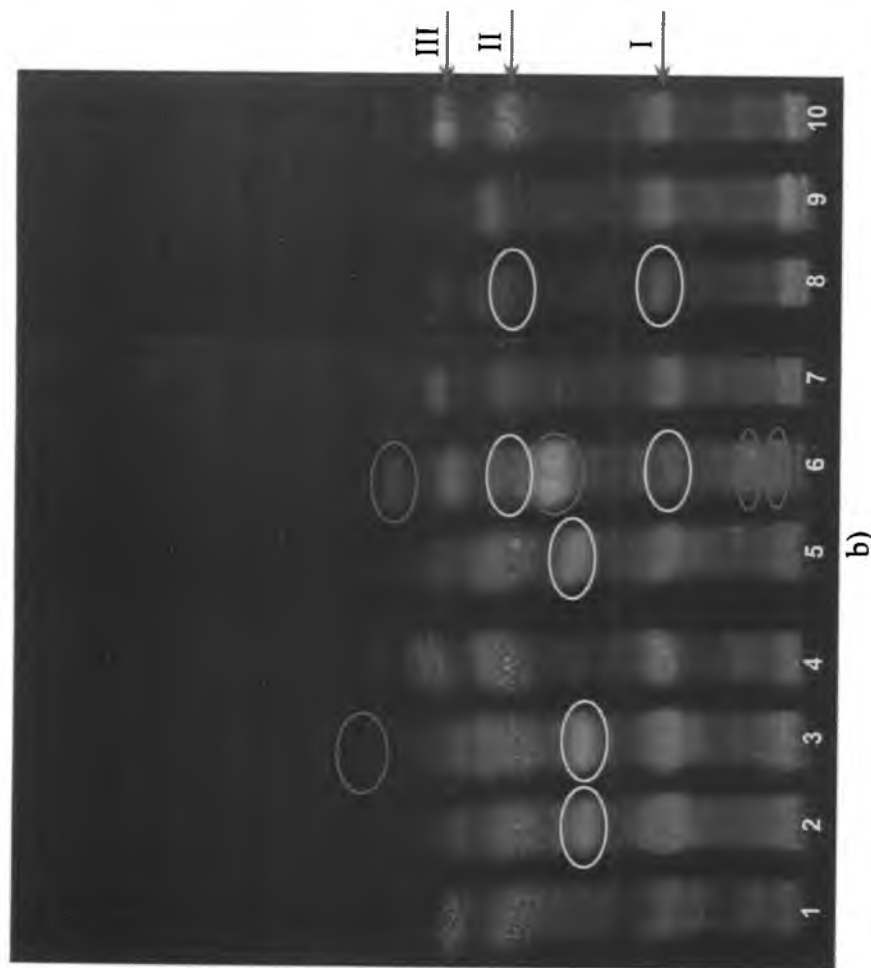
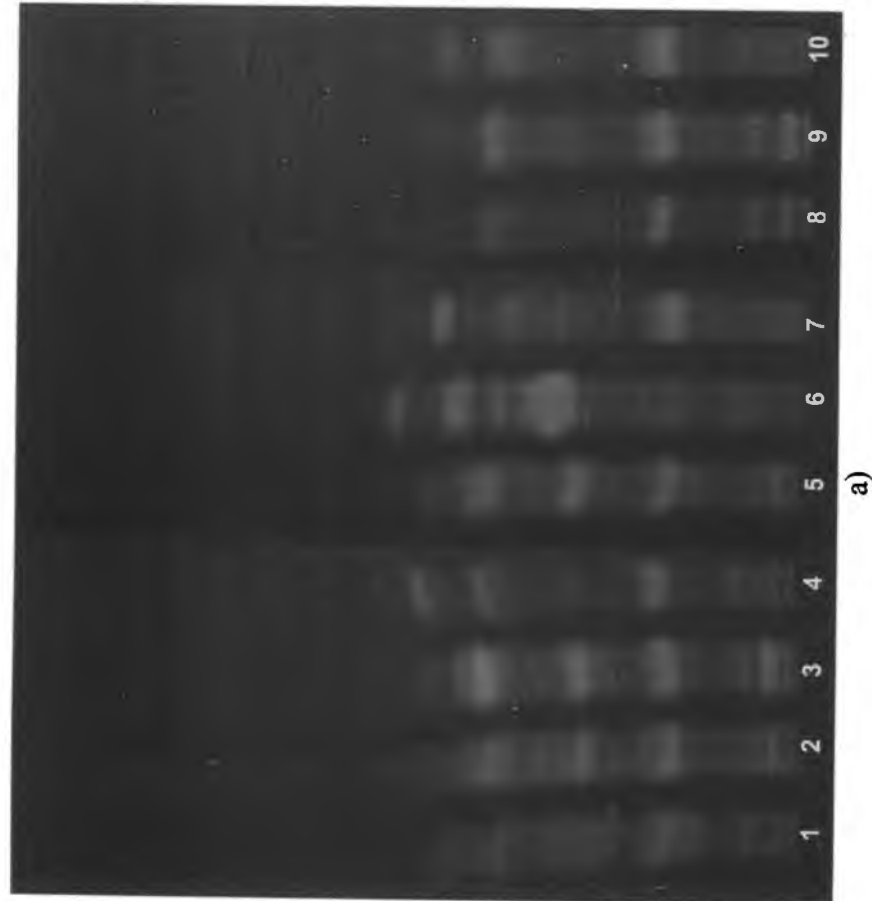


a)

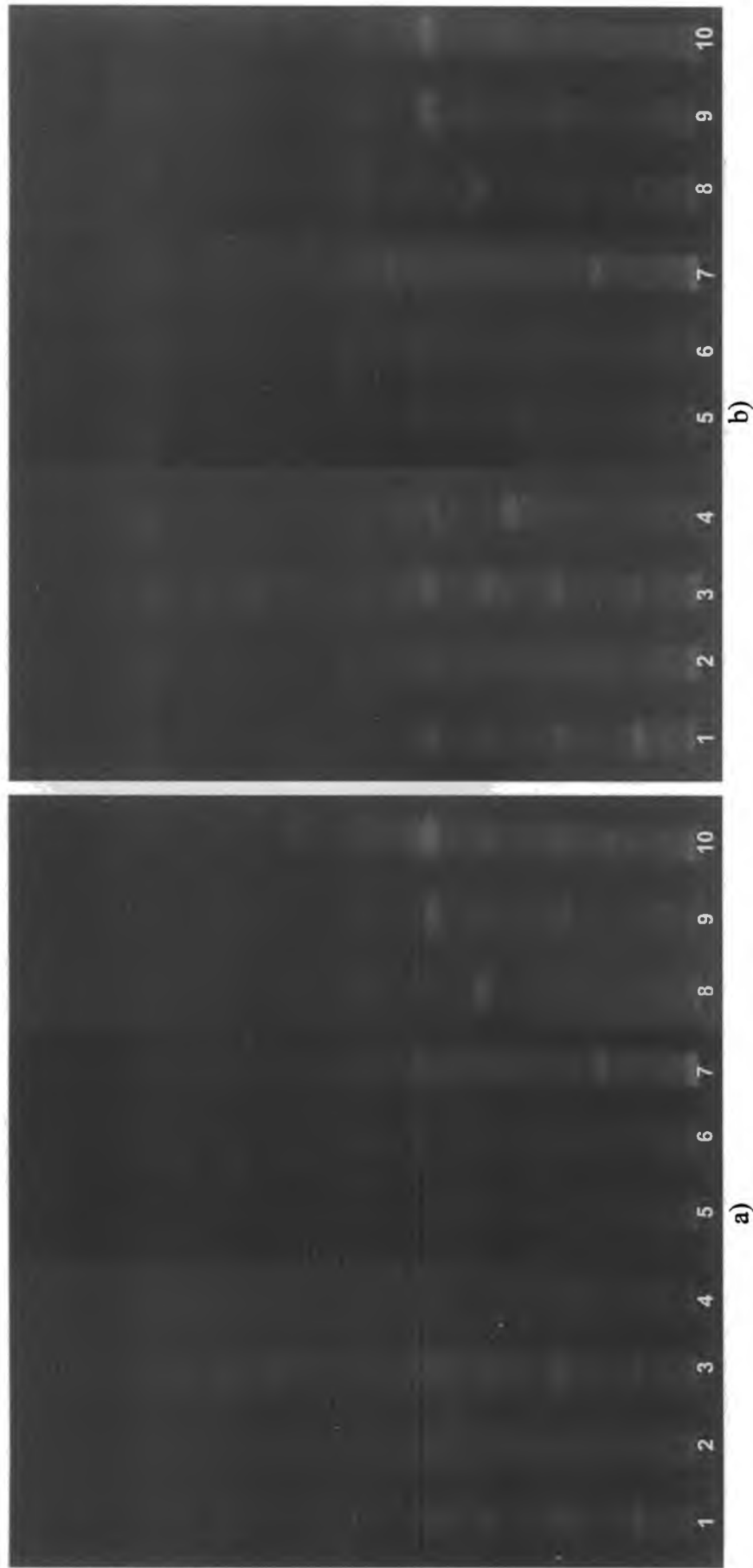


b)

Rys. 68. Zdjęcia chromatogramów frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy kwasowej (KKF) dziesięciu wybranych gatunków szalwii: a) Chromatogramy przed wywołaniem, b) chromatogramy po wywołaniu. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: benzen + octan etylu + kwas mrówkowy, 6 : 3 : 1 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja zdjęć chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery umieszczone na chromatogramach odpowiadają poszczególnym gatunkom szalwii: 1 – *S. sclarea*, 2 – *S. staminea*, 3 – *S. hians*, 4 – *S. officinalis*, 5 – *S. verticillata*, 6 – *S. azurea*, 7 – *S. cadmica*, 8 – *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, 9 – *S. glutinosa*, 10 – *S. triloba*. — pasma występujące we wszystkich lub w większości badanych gatunków szalwii, pasma różniące się intensywnością, — pasma charakterystyczne dla badanych gatunków szalwii.



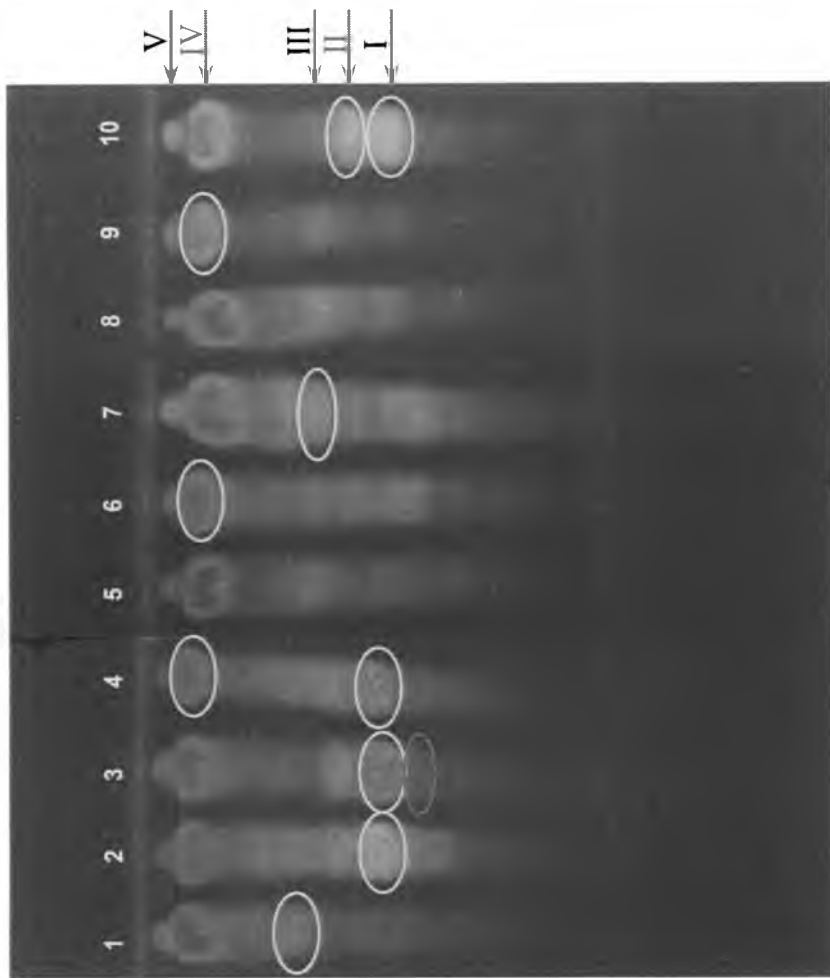
Rys. 69. Zdjęcia chromatogramów frakcji kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy zasadowej (ZKF) dziesięciu wybranych gatunków szatwii: a) Chromatogramy przed wywołaniem, b) chromatogramy po wywołaniu. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: benzen + octan etylu + kwas mrówkowy, 6 : 3 : 1 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja zdjęć chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery umieszczone na chromatogramach odpowiadają poszczególnym gatunkom szatwii: 1 – *S. sclarea*, 2 – *S. staminea*, 3 – *S. hians*, 4 – *S. officinalis*, 5 – *S. verticillata*, 6 – *S. azurea*, 7 – *S. cadmica*, 8 – *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, 9 – *S. glutinosa*, 10 – *S. triloba*. — pasma występujące we wszystkich lub w większości badanych gatunków szatwii, - - - pasma różniące się intensywnością, — pasma charakterystyczne dla badanych gatunków szatwii.



Rys. 70. Zdjęcia chromatogramów frakcji aglikonów flawonoidowych (AF) dziesięciu wybranych gatunków szatwii a) Chromatogramy przed wywołaniem, b) chromatogramy po wywołaniu. Faza stacjonarna: SiO_2 , Faza ruchoma: toluen + octan etylu + kwas mrówkowy, 12 : 6 : 1 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolewowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja zdjęć chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery umieszczone na chromatogramach odpowiadają poszczególnym gatunkom szatwii: 1 – *S. staminea*, 2 – *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, 3 – *S. glutinosa*, 4 – *S. officinalis*, 5 – *S. verticillata*, 6 – *S. triloba*, 7 – *S. sclarea*, 8 – *S. hians*, 9 – *S. azurea*, 10 – *S. cadmica*. — pasma występujące we wszystkich lub w większości badanych gatunków szatwii, pasma różniące się intensywnością, — pasma charakterystyczne dla badanych gatunków szatwii.

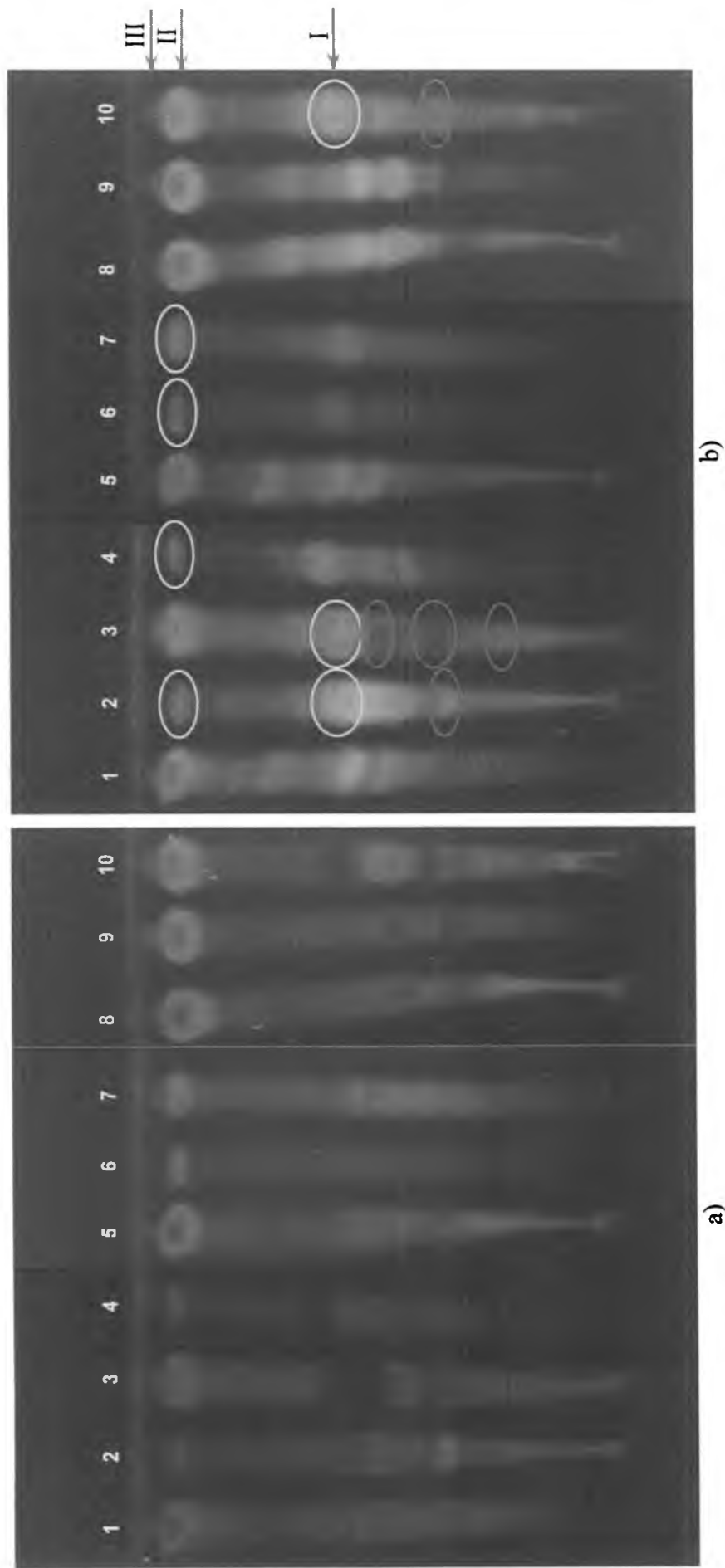


a)



b)

Rys. 71. Zdjęcia chromatogramów octanowej frakcji glikozydów flawonoidowych (GFO) dziesięciu wybranych gatunków szalwii a) Chromatogramy przed wywołaniem, b) chromatogramy po wywołaniu. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy, 100 : 26 : 11 : 11 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja zdjęć chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery umieszczone na chromatogramach odpowiadają poszczególnym gatunkom szalwii: 1 – *S. staminea*, 2 – *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, 3 – *S. glutinosa*, 4 – *S. officinalis*, 5 – *S. verticillata*, 6 – *S. triloba*, 7 – *S. sclarea*, 8 – *S. hians*, 9 – *S. azurea*, 10 – *S. cadmica*. — pasma występujące we wszystkich lub w większości badanych gatunków szalwii, --- pasma różniące się intensywnością, — pasma charakterystyczne dla badanych gatunków szalwii.

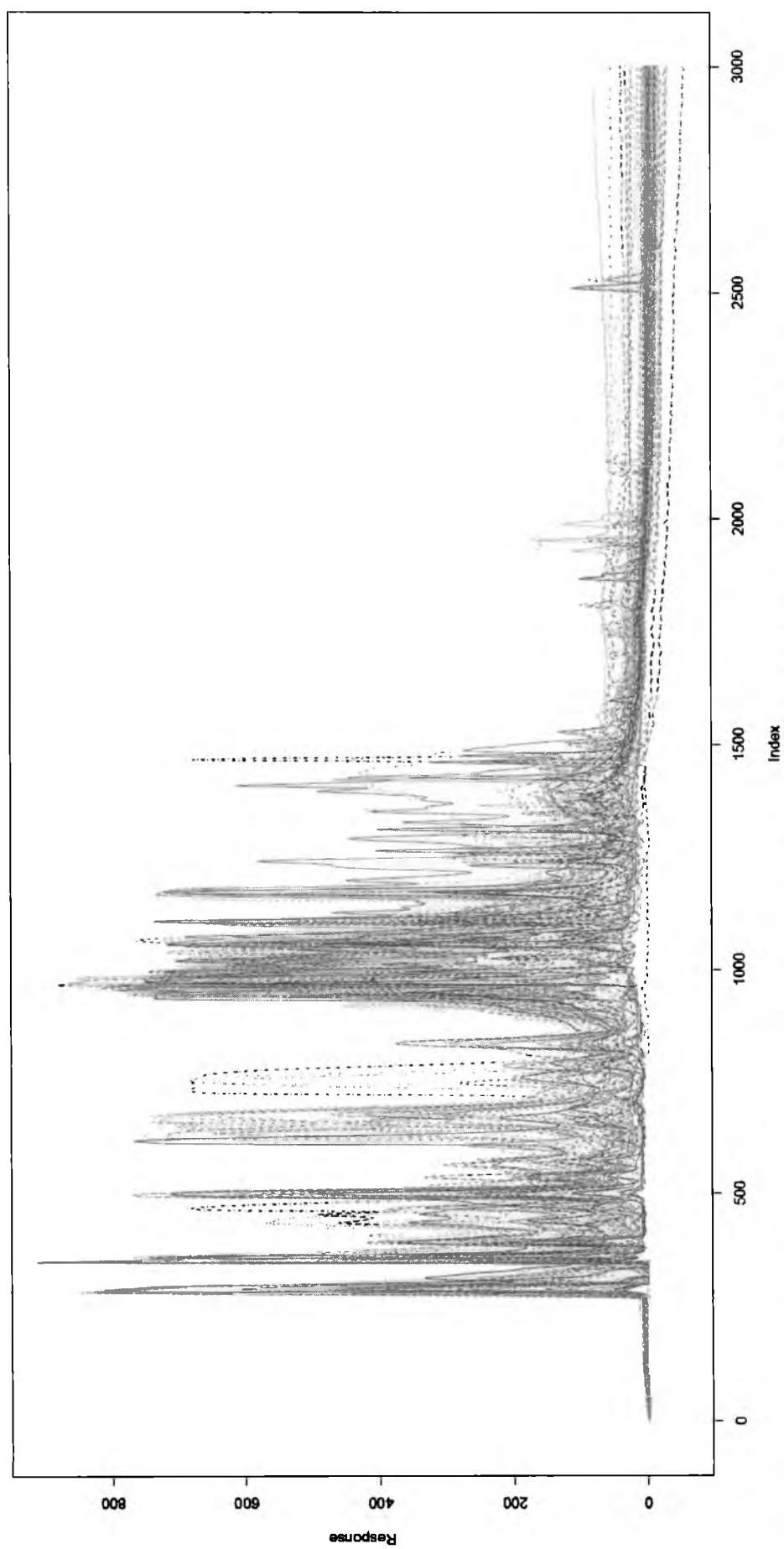


Rys. 72. Zdjęcia chromatogramów butanolowej frakcji glikozydów flawonoidowych (GFB) dziesięciu wybranych gatunków szalwii a) Chromatogramy przed wywołaniem, b) chromatogramy po wywołaniu. Faza stacjonarna: SiO_2 . Faza ruchoma: octan etylu + woda + kwas mrówkowy + kwas octowy, 100 : 26 : 11 : 11 (v/v). Odległość rozwijania: 15 cm. Odczynnik wywołujący: 1% metanolowy roztwór chlorku glinu. Rejestracja zdjęć chromatogramów przy długości fali świetlnej $\lambda = 366 \text{ nm}$. Numery umieszczone na chromatogramach odpowiadają poszczególnym gatunkom szalwii: 1 – *S. staminea*, 2 – *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, 3 – *S. glutinosa*, 4 – *S. officinalis*, 5 – *S. verticillata*, 6 – *S. triloba*, 7 – *S. sclarea*, 8 – *S. hians*, 9 – *S. azurea*, 10 – *S. cadmica*. — pasma występujące we wszystkich lub w większości badanych gatunków szalwii, pasma różniące się intensywnością, — pasma charakterystyczne dla badanych gatunków szalwii.

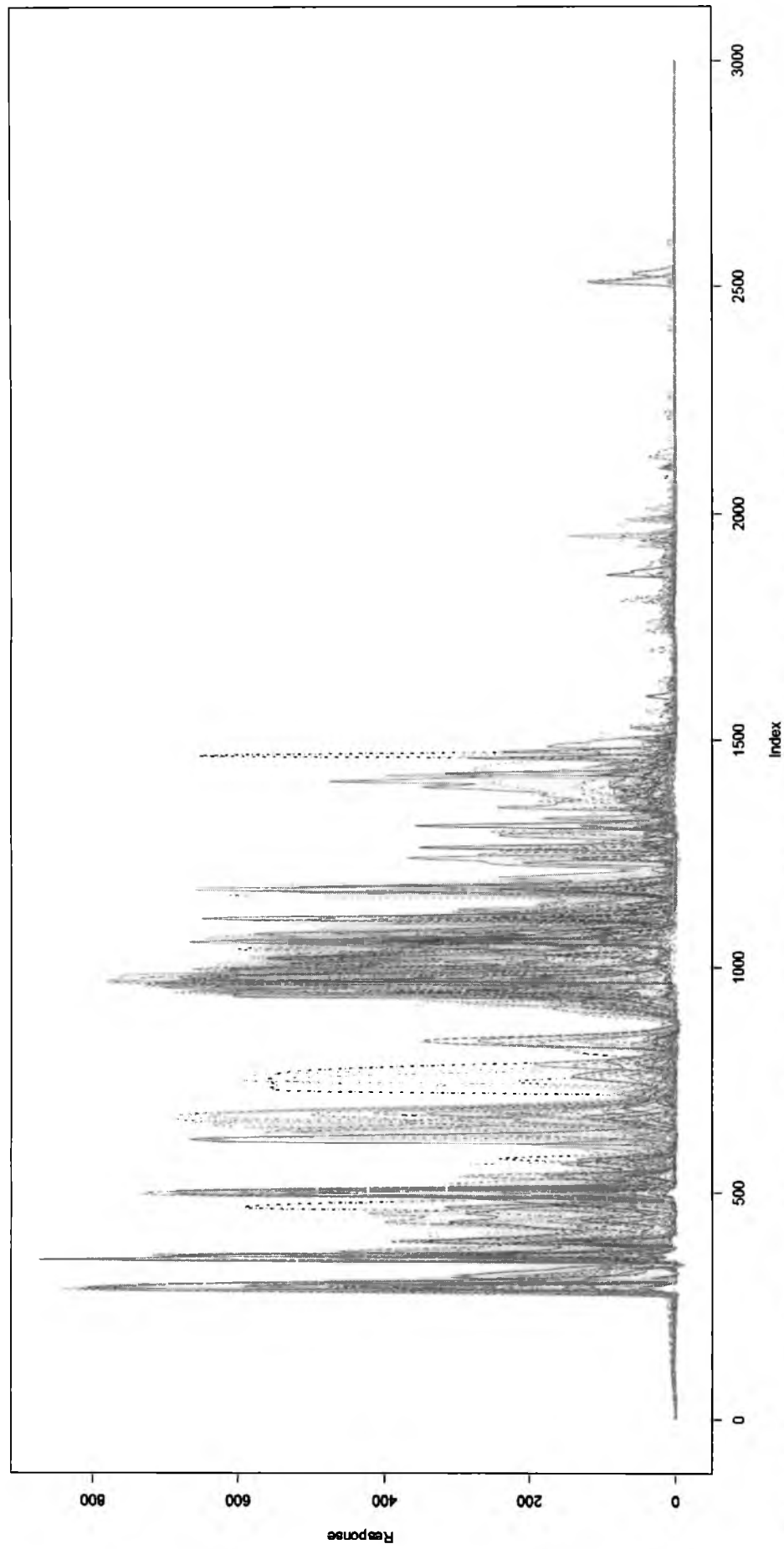
Uzyskany w niniejszych badaniach zbiór chromatogramów HPLC/DAD i HPLC/ELSD poddano następnie analizie chemometrycznej. Niestety podczas wstępnego przygotowywania danych okazało się, że chromatogramy uzyskane przy użyciu detektora ELSD nie są odpowiednim materiałem do dalszej analizy, głównie z powodu licznych przeładowań stężeniowych układu chromatograficznego.

Analizowane chromatogramy (DAD) były traktowane jako odciski palca, co oznacza, iż w toku analizy chemometrycznej nie identyfikowano poszczególnych pików. Każdy chromatogram uzyskany przy użyciu detektora DAD stanowił wektor o długości 3001 punktów, a zatem macierz miała wymiary 60 wierszy na 3001 kolumn (Rys. 73). W pierwszym kroku analizy chemometrycznej usunięto z chromatogramów różnice wynikające z linii bazowej. W tym celu zastosowano algorytm iteracyjnie ważonej regresji penalizowanej [162] oraz regresję kwantylową [187]. Ze względu na nieskomplikowaną linię bazową oba algorytmy działały bardzo podobnie, lecz do dalszej analizy wybrano linię bazową usuniętą algorytmem iteracyjnie ważonej regresji penalizowanej (Rys. 74.). Następnie z każdego chromatogramu wycięto fragment o indeksach 250 – 2550 (wcześniejsze i późniejsze fragmenty zawierają samą linię bazową i nie mają w sobie użytecznej informacji). Następnie sygnały złożono ze sobą, tworząc macierz o 10 wierszach (gatunki szalwii) i 13806 kolumnach (wszystkie chromatogramy złożone ze sobą, Rys. 75.). Tak opracowane sygnały poddano nakładaniu celem niwelacji przesunięć w retencji, stosując do tego algorytm PTW (*PTW* – ang. *Parametric Time Warping*) [93]. Warping zastosowano po złożeniu sygnałów ze względu na to, że chromatogramy różniły się znacznie kształtem pomiędzy frakcjami, a były podobne w obrębie jednej frakcji między gatunkami. Jako próbkę referencyjną wybrano chromatogram mający najwyższą średnią korelację z pozostałymi próbkami [167]. W tym przypadku była to próbka *Salvia hians*. Nałożone sygnały przedstawiono na rysunku 76. Następnie sygnały te poddano analizie PCA. Dwie pierwsze składowe wyjaśniały 45% wariancji, cztery pierwsze łącznie – 69% wariancji. Analiza wektorów obciążeń (Rys. 77.) wykazała wyraźne trendy związane ze zmianami stężeń poszczególnych związków dla czterech pierwszych głównych składowych, zaś w przypadku piątej głównej składowej wykres wektora obciążeń wykazywał już wyraźniejszy szum. Dlatego uznano, że istotne różnice między gatunkami mogą być reprezentowane przez 4 niezależne główne składowe (Rys. 78 a i b). Na projekcji wyników widoczne są dwie próbki, które są oddalone od pozostałych próbek. Są to ekstrakty *S. staminea* (próbka 2 widoczna przy największej wartości trzeciego czynnika głównego PC3) i *S. azurea* (próbka 6 widoczna przy największej wartości czwartego czynnika głównego PC4).

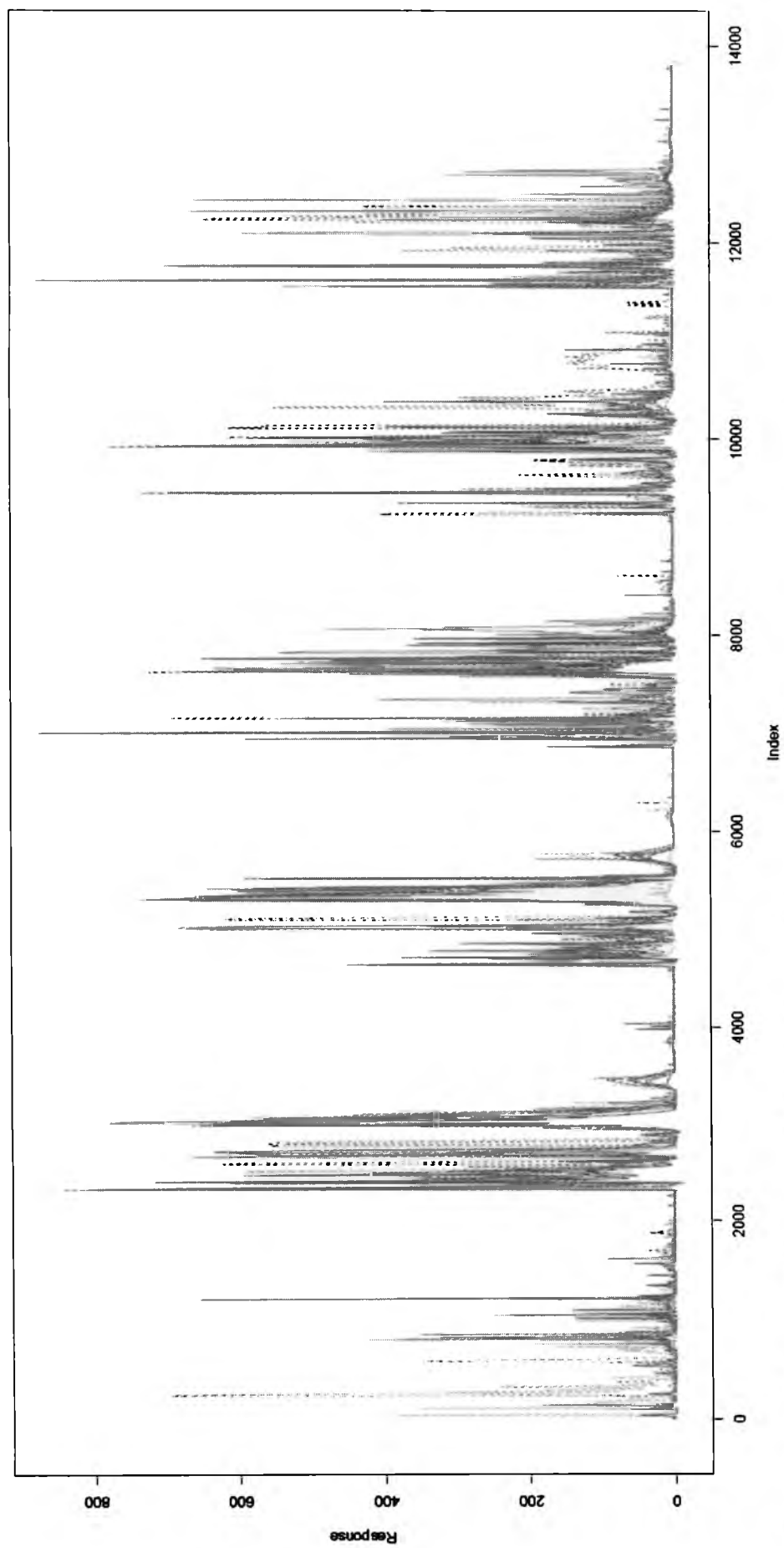
Podsumowując, przeprowadzona analiza chemometryczna umożliwiła znalezienie istotnych różnic między dziesięcioma badanymi gatunkami szalwii, mimo znacznych podobieństw chromatogramów w obrębie każdej z analizowanych frakcji. Zatem, słusznym wydaje się stwierdzenie, iż wielostopniowa ekstrakcja połączona z analizą chromatograficzną jest dobrym narzędziem do konstrukcji charakterystycznych fingerprinów, natomiast analiza chemometryczna uzyskanych chromatogramów pozwala na ustalenie różnic w składzie chemicznym badanych próbek, co jest istotne z punktu widzenia chemotaksonomii.



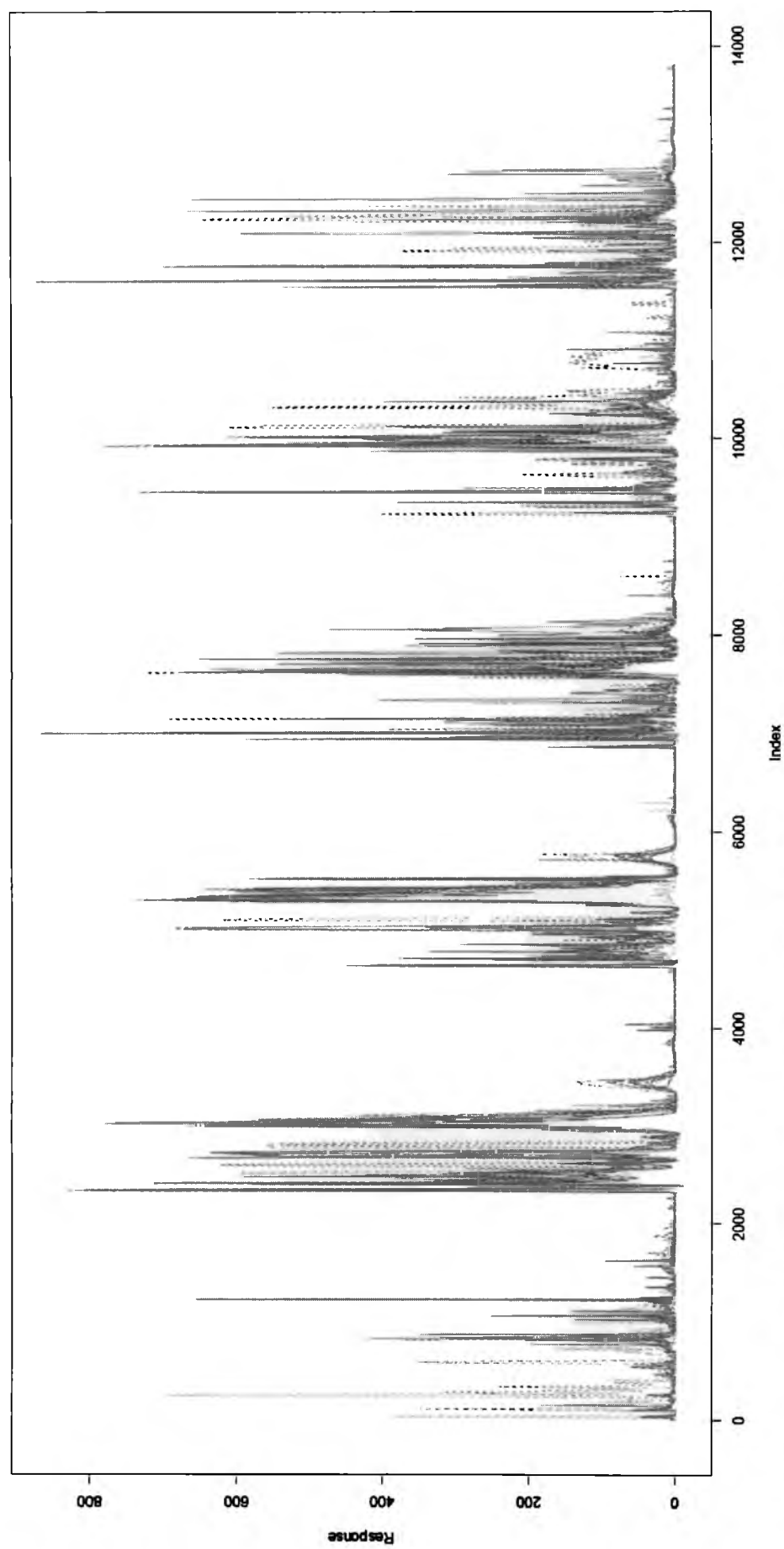
Rys. 73. Nałożone chromatogramy HPLC/DAD dziesięciu gatunków szalwii dla sześciu badanych frakcji przed usunięciem linii bazowej.



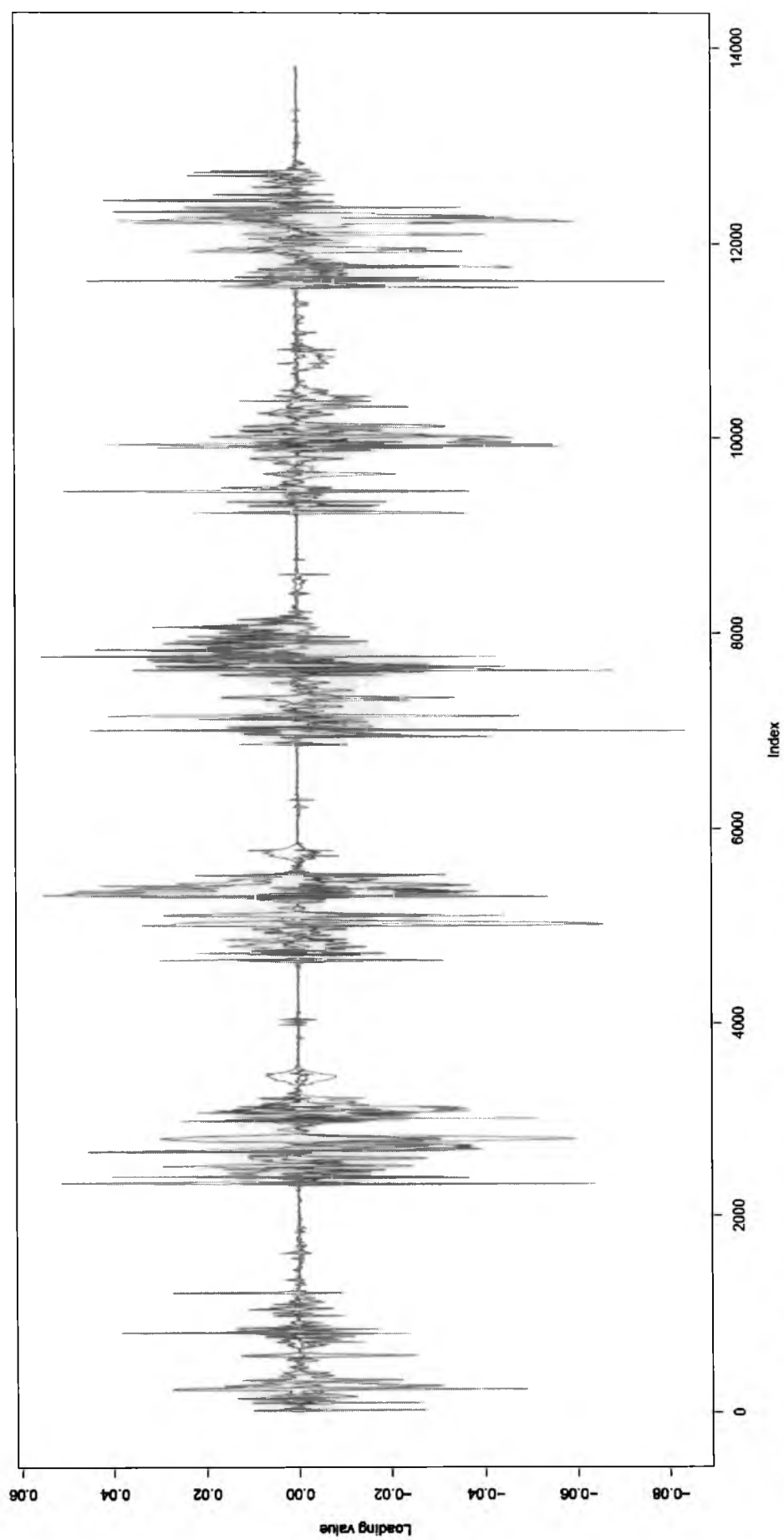
Rys. 74. Nalożone chromatogramy HPLC/DAD dziesięciu gatunków szatwii dla sześciu badanych frakcji po usunięciu linii bazowej.



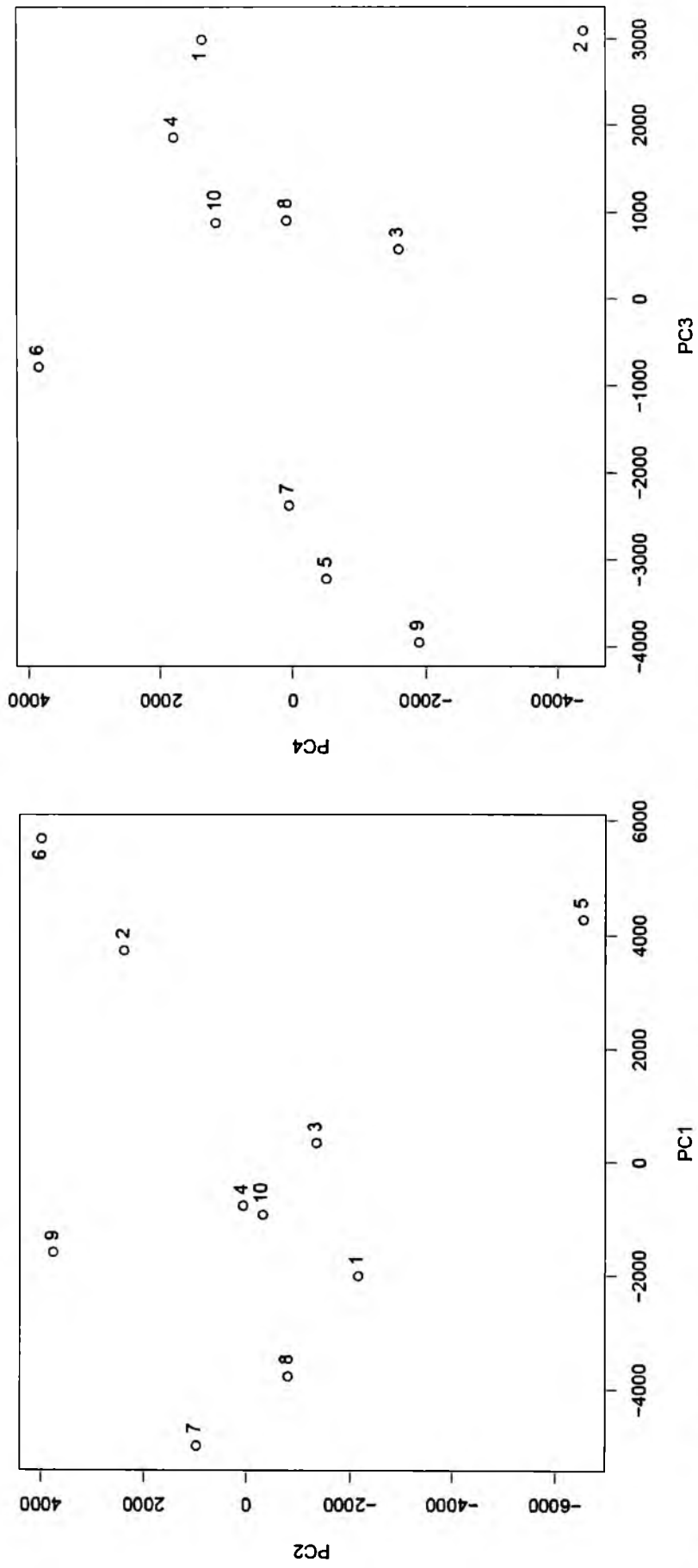
Rys. 75. Nałożone fragmenty chromatogramów o indeksach 250 – 2550.



Rys. 76. Nałożone fragmenty chromatogramów o indeksach 250 – 2550 po ich dopasowaniu przy użyciu algorytmu PTW.



Rys. 77. Wektory obciążeń dla czterech pierwszych głównych składowych.



Rys. 78. Projektja dziesięciu gatunków szatwii na płaszczyznę zdefiniowaną przez: a) pierwszy i drugi czynnik główny PC1 – PC2, b) trzeci i czwarty czynnik główny PC3 – PC4.

Podsumowanie i wnioski

1. Za najefektywniejszą metodę ekstrakcji uznano tę, w której materiał roślinny najpierw ekstrahowano n-heksanem, a następnie metanolem, techniką ciśnieniowej ekstrakcji cieczerwowej (ASE).
2. Technika jednokierunkowej, izokratycznej chromatografii cienkowarstwowej jest niewystarczająca w przypadku analizy porównawczej złożonych próbek zawierających związki o różnej polarności.
3. Na podstawie binarnych fingerprintów HPTLC stwierdzono, iż profil chemiczny gatunku *S. triloba* jest najbardziej zbliżony do profilu chemicznego *S. officinalis*. Porównując zawartość związków fenolowych stwierdzono, że *S. officinalis* charakteryzuje się największą sumaryczną powierzchnią rozdzielonych pików. Innymi gatunkami o znaczącej sumarycznej powierzchni pików są: *S. lavandulifolia*, *S. triloba*, *S. nemorosa*, *S. jurisicii*, *S. azurea* oraz *S. atropatana*. Natomiast gatunkami o najmniejszej sumarycznej powierzchni pików okazały się *S. sclarea*, *S. deserta* i *S. staminea*. Z kolei gatunkami o największej zawartości kwasu kawowego są: *S. officinalis*, *S. nemorosa*, *S. lavandulifolia*, *S. triloba*, *S. azurea* i *S. jurisicii*, podczas gdy gatunki *S. lavandulifolia*, *S. jurisicii*, *S. azurea*, *S. hians*, *S. pratensis ssp. Haematodes* oraz *S. nemorosa* wykazały największą zawartość kwasu p-kumarowego.
4. Konstrukcja binarnych fingerprintów umożliwiła analizę ekstraktów w szerokim spektrum polarności a ponadto wydaje się, że metoda ta jest najlepszym wyborem do konstrukcji charakterystycznych odcisków palca dla badanych gatunków szalwii.
5. Zastosowanie techniki GMD umożliwia analizę złożonych ekstraktów zawierających substancje o szerokim spektrum polarności, gdyż pozwala na porównanie wielu frakcji o odmiennych właściwościach.
6. Technika MGD umożliwia rozdzielenie substancji różniących się polarnością, jednakże w przypadku bardzo złożonych próbek ilość całkowicie rozdzielonych plamek jest o wiele mniejsza w porównaniu do ilości uzyskanej przy zastosowaniu techniki GMD.
7. Technika dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej na chemicznie związanej fazie stacjonarnej typu cyjanowego umożliwia uzyskanie charakterystycznych „fingerprintów” poszczególnych gatunków szalwii. Problemem jest jednak granica wykrywalności poszczególnych składników próbki, która jest mniejsza w przypadku zastosowania tej techniki. Jest to spowodowane zmniejszającym się stężeniem próbki przypadającym na jednostkę powierzchni adsorbentu w trakcie dwukierunkowego rozwijania.
8. W przypadku wszystkich gatunków szalwii najsilniejszy potencjał antyoksydacyjny wykazał kwas rozmarynowy. Z kolei w przypadku gatunków *S. officinalis* i *S. atropatana* silny potencjał antyoksydacyjny wykazał kwas kawowy, natomiast najmniejszą aktywność antyoksydacyjną wykazał ekstrakt *S. deserta*.
9. Na podstawie porównania binarnych fingerprintów HPLC-DAD i HPLC-ELSD stwierdzono, że mimo widocznych różnic sezonowych, dla każdego z badanych gatunków szalwii udało się uzyskać charakterystyczne fingerprinty.

10. Analiza czynników głównych (PCA) umożliwiła wytypowanie spośród dwudziestu badanych próbek, dwóch znacznie różniących się składem chemicznym, mianowicie *S. glutinosa* i *S. officinalis*. Unikalność próbki *S. glutinosa* można wyjaśnić obecnością intensywnego piksu przy czasie retencji (t_R) wynoszącym 18,75 min., natomiast dla próbki *S. officinalis* jest to obecność piksu o stosunkowo dużej intensywności przy czasie retencji wynoszącym 11,92 min.
11. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że procedura spektrofotometrycznego oznaczania zarówno sumy kwasów fenolowych, jak i sumy flawonoidów nie jest doskonała.
12. Zastosowanie fazy stacjonarnej typu C₁₈ podczas analizy 1D TLC-MS oraz 2D TLC-LC-MS okazało się najlepszym wyborem adsorbentu dla grupowego rozdzielania kwasów fenolowych, selektywnie wyekstrahowanych z *S. lavandulifolia* oraz do identyfikacji składników tego ekstraktu z użyciem substancji wzorcowych.
Ponadto z wyników uzyskanych przy zastosowaniu chromatografii cienkowarstwowej wynika, że ekstrakt *S. lavandulifolia* zawiera kwas chlorogenowy, którego wcześniej nie zidentyfikowano w tym konkretnym gatunku. Na podstawie fingerprintowania zarówno w normalnym jak i odwróconym układzie faz przy użyciu spektrometrii masowej ekstraktów zawierających związki fenolowe, pokazano, że wstępny rozdział ekstraktów (TLC), a następnie wykorzystanie dwóch wariantów analizy, tj. 1D TLC-MS oraz 2D TLC-LC-MS, dostarcza wielu informacji, które mogą być wykorzystane w chemotaksonomii, jak również mogą posłużyć do celów identyfikacyjnych roślin.
13. Analiza spektrofotometryczna 24 ekstraktów różnych gatunków szalwii zebranych w 2009 roku miała na celu międzygatunkowe porównanie procentowej zawartości flawonoidów oraz wyselekcjonowanie spośród badanych gatunków tych o największej zawartości, co bezsprzecznie udało się osiągnąć. Mimo pewnych rozbieżności między wynikami uzyskanymi spektrofotometrycznie a wynikami uzyskanymi techniką HPLC/DAD, chromatogramy pięciu wybranych gatunków szalwii potwierdziły słuszność wyników otrzymanych podczas analizy spektrofotometrycznej. Na podstawie wstępnych wyników, prezentowanych w niniejszej pracy wydaje się, iż wszystkie z czterech wybranych na podstawie analizy spektrofotometrycznej gatunki szalwii, tj. *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. glutinosa*, *S. staminea* oraz *S. triloba* mogą z powodzeniem konkurować z *S. officinalis* pod względem właściwości terapeutycznych, szczególnie takich, które są związane ze znaczącą zawartością flawonoidów w materiale roślinnym.
14. Mimo stosunkowo niewielkiej zawartości związków frakcja aglikonów flawonoidowych (AF) wykazuje największe zróżnicowanie wśród badanych gatunków szalwii. Ponadto fingerprinty frakcji WKF, KKF, ZKF, GFO oraz GFB uzyskane dla gatunku *S. triloba* wydają się być najbardziej zbliżone do profili chromatograficznych *S. officinalis*. Analiza czynników głównych (PCA) umożliwiła wytypowanie spośród dziesięciu badanych próbek, dwóch znacznie różniących się składem chemicznym, mianowicie *S. staminea* i *S. azurea*.

Lista prac własnych tematycznie związanych z rozprawą doktorską

1. „A comparison of TLC and HPLC fingerprints of phenolic acids and flavonoids fractions derived from selected sage (*Salvia*) species” M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (w druku)
2. "The HPLC/DAD fingerprints and chemometric analysis of flavonoid extracts from the selected sage (*Salvia*) species” M. Sajewicz, **D. Staszek**, M.S. Wróbel, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska *Chromatography Research International*, doi:10.1155/2012/230903 (8 pages)
3. "TLC-MS versus TLC-LC-MS fingerprints of herbal extracts. Part III. Application of the reversed phase liquid chromatography systems with C18 stationary phase" M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska *Journal of Chromatographic Science*, 49, 560-567 (2011)
4. "TLC-MS versus TLC-LC-MS fingerprints of herbal extracts. Part II. Phenolic acids and flavonoids" M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Natić, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34, 864-887 (2011)
5. "Binary HPLC-Diode Array Detector and HPLC-Evaporative Light Scattering Detector fingerprints of methanol extracts from the selected sage (*Salvia*) species" M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos *Journal of AOAC Int.*, 94, 71-76 (2011)
6. "Development of chromatographic and free radical scavenging activity fingerprints by thin-layer chromatography for selected *Salvia* species" Ł. Ciesła, **D. Staszek**, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos *Phytochemical Analysis*, D22, 59-65 (2011)
7. "Validated binary high-performance thin-layer chromatographic fingerprints of polyphenolics for distinguishing different *Salvia* species" Ł. Ciesła, M. Hajnos, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos *Journal of Chromatographic Science*, 48, 421-427 (2010)
8. "Comparative analysis of the chromatographic fingerprints of twenty different sage (*Salvia* L.) species" M. Daszykowski, M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak *Acta Chromatogr.*, 21, 513-530 (2009)
9. "TLC-based start-to-end method of analysis of selected biologically active compounds contained in common sage (*Salvia officinalis* L.)" G. Grygierczyk, M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 1223-1240 (2009)
10. "On optimization of the double development mode applied to separation of the fraction of phenolic acids and flavonoids from the extracts of *Salvia officinalis* L." G. Grygierczyk, M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska *Annales UMCS, Sectio DDD Pharmacia*, 21, 37-43 (2008)

Lista publikacji konferencyjnych tematycznie związanych z rozprawą doktorską

1. "Binary HPLC–DAD and HPLC–ELSD fingerprints of the flavonoid extracts from the selected *Salvia* species"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Wróbel, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
4th Conference on Drug Synthesis and Analysis, Brno (Czechy), 12-14.09.2011
2. "TLC and HPLC comparison of the phenolic acid and flavonoid levels in the selected sage (*Salvia*) species"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, K. Sobczyk, E. Recmanik, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
International Symposium for High-Performance Chromatography, Basel (Szwajcaria), 6-8.07.2011
3. "The HPLC analysis of the selected extract fractions derived from a variety of the sage (*Salvia*) species"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, M.S. Wróbel, E. Recmanik, K. Sobczyk, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
XXXIVth Chromatographic Symposium, Katowice - Szczyrk (Polska), 8-10.06.2011
4. „The HPLC analysis of the selected extract fractions derived from a variety of the sage (*Salvia*) species”
M. Sajewicz, D. Staszek, E. Recmanik, K. Sobczyk, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
V Seminarium Naukowe "Aktualne Problemy Chemii Analitycznej", Katowice (Polska), 13.05.2011
5. "A comparative analysis of the essential oils, phenolic acids, and flavonoids in the selected sage (*Salvia*) species"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
International Conference on Chemistry: Frontiers and Challenges, Aligarh Muslim University (AMU)", Aligarh (Indie), 5-6. 03.2011
6. "A comparison of the phenolic compounds derived from *Salvia lavandulifolia* with use traditional and alternative fingerprinting methods.”
D. Staszek, M. Natić, M. Sajewicz, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
II Międzynarodowe Sympozjum Edukacyjne nt. „Społeczeństwo i zdrowie”, Zakopane (Polska), 23-26.11.2010
7. "A comparison of traditional and alternative fingerprinting methods with phenolic compounds derived from plant material"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
5th Congress of the Pharmacists of Serbia "Od leka do zdravstvenih ishoda", Belgrad (Serbia), 13-17.10.2010
8. "Development of binary chemical and antioxidant fingerprints for selected *Salvia* species and its related preparations.”
Ł. Cieśla, **D. Staszek**, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos
7th International Symposium on Chromatography of Natural Products & 6th International Symposium of the International Society for the Development of Natural Products, Lublin (Polska), 14-17.06.2010
9. "The analysis of extracts derived from twenty different sage (*Salvia* L.) species by means of HPLC (DAD and ELSD), and determination of the sum of phenolic compounds.”
M. Sajewicz, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska

- 7th International Symposium on Chromatography of Natural Products & 6th International Symposium of the International Society for the Development of Natural Products, Lublin (Polska), 14-17.06.2010
10. "A comparison of the phenolic compound fingerprints derived from selected sage (*Salvia*) species with use of TLC-MS and TLC-LC-MS systems."
M. Sajewicz, D. Staszek, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
7th International Symposium on Chromatography of Natural Products & 6th International Symposium of the International Society for the Development of Natural Products, Lublin (Polska), 14-17.06.2010
 11. "A comparison of the phenolic compound fingerprints derived from selected sage (*Salvia*) species with use of thin-layer chromatography directly and indirectly coupled with mass spectrometry"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
XXXIII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 25-27.05.2010
 12. "Spectrophotometric determination of the sum of phenolic acids and flavonoids contained in twenty different sage (*Salvia* L.) species and the analysis of the sage extracts by means of HPLC-DAD and HPLC-ELSD"
M. Sajewicz, **D. Staszek**, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
XXXIII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk (Polska), 25-27.05.2010
 13. "Analysis of different sage (*Salvia* L.) species by means of TLC/densitometry."
M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, Ł. Cieśla, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
II Ogólnopolskie Sympozjum "Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych", Lublin (Polska), 24-25.09.2009
 14. "A comparison of the separation and quantification performance of HPLC-DAD and HPLC-ELSD with the selected sage (*Salvia* L.) species."
M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
II Ogólnopolskie Sympozjum "Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych", Lublin (Polska), 24-25.09.2009
 15. "One- and Multidimensional Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids from the Different *Salvia* Species."
M. Sajewicz, Ł. Cieśla, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok (Węgry),
2-4.09.2009
 16. "Chemometrics in comparative analysis of chromatographic fingerprints of the extracts from different sage (*Salvia* L.) species."
M. Daszykowski, Ł. Wojtal, **D. Staszek**, M. Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak
XXXII Scientific Symposium "Chromatographic methods of investigating organic compounds", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009
 17. "A comparison of the phenolic acid and flavonoid contents in twenty different sage species (*Salvia* species L.) by means of HPLC/DAD."
M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, K. Mitera, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
XXXII Scientific Symposium "Chromatographic methods of investigating organic compounds", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009

18. "A comparison of the phenolic acid and flavonoid contents in twenty different sage species (*Salvia* species L.) by means of TLC/densitometry."
M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, A. Mikołajek, Ł. Cieśla, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
XXXII Scientific Symposium "Chromatographic methods of investigating organic compounds", Katowice-Szczyrk (Polska), 3-5.06.2009
19. "TLC/densitometry and HPLC/DAD studies of flavonoids in *Salvia officinalis* L."
G. Grygierczyk, M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
6th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin (Polska), 15-18.06.2008
20. "TLC/densitometry and HPLC/DAD studies of phenolic acids in *Salvia officinalis* L."
G. Grygierczyk, M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
6th International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin (Poland), 15-18.06.2008
21. "Optimization of the separation of phenolic acids and flavonoids from the extracts of *Salvia officinalis* L."
G. Grygierczyk, M. Sajewicz, **D. Staszek**, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska
Seminarium Naukowe "Aktualne Problemy Chemii Analitycznej", Katowice (Polska), 30.05.2008

Życiorys

Imię i nazwisko: Dorota Staszek
Data i miejsce urodzenia: 21.06.1983, Tarnowskie Góry
Stan cywilny: panna
Adres zamieszkania: ul. Nakielska 14/1, 42-600 Tarnowskie Góry

Wykształcenie:

Od 2007: słuchaczka Studium Doktoranckiego przy Instytucie
Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
2002-2007 Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Mat-Fiz-
Chem.,
kierunek: chemia
Specjalność: Właściwości fizykochemiczne związków
organicznych i nieorganicznych
1998–2002 IV Liceum Ogólnokształcące w Tarnowskich Górach

Doświadczenie**zawodowe:**

01.10.2007 Rozpoczęcie studiów doktoranckich stacjonarnych
na kierunku Chemia, Uniwersytet Śląski w Katowicach
01.10.2007 – 30.06.2010 Umowa o pracę z Uniwersytetem Śląskim na stanowisku
01.03.2012 – 30.09.2012 asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Chemii
Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii na Wydziale
Matematyki, Fizyki i Chemii
01.10.2008 – 30.09.2009 Stypendium doktoranckie przyznane przez
Jego Magnificencję Rektora Uniwersytetu Śląskiego
Prof. dr hab. Janusza Janeczka
01.10.2009 – 30.09.2011 Stypendium doktoranckie w ramach projektu
„Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy”
(UPGOW) współfinansowanego przez Unię Europejską
w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (EFS)

LITERATURA

- [1] B. Kuźnicka, A. Dziak *Zioła lecznicze – historia, zbiór i stosowanie*. PZWL, Warszawa 1967
- [2] D. Tyszyńska-Kownacka *Zioła na działce i w ogródku przydomowym*. Wydawnictwo „Warta”, Warszawa 1978
- [3] <http://www.biodiversitylibrary.org/page/303638#page/311/mode/1up>
- [4] M. Romer *Aromaterapia. Leksykon roślin leczniczych*. MedPharm, 2009
- [5] L. Samochowiec, *Kompendium ziołolecznictwa*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2002
- [6] A. Rausch, B. Lotz, *Leksykon zioła* Wydawnictwo Elipsa, Warszawa, 2006
- [7] M.E. Senderski, *Prawie wszystko o ziołach* Podkowa Leśna 2007
- [8] B.E. Wyk, M. Wink, *Rośliny lecznicze świata* MedPharm Wrocław, 2008
- [9] A. Sarwa *Wielki leksykon roślin leczniczych* Wydawnictwo Książka i Wiedza, Warszawa 2001
- [10] B. Broda, J. Mowszowicz, *Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych*. PZWL Warszawa 2000
- [11] B. Pawłowski, *Flora polska, rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych*. PWN, Warszawa- Kraków 1963
- [12] S. Kohlmünzer, *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007
- [13] R.A. Dixon, N.I. Paiva, *Plant Cell*, **7**, 1085-1097 (1995)
- [14] J. Kopcewicz, S. Lewak, *Podstawy fizjologii roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1998
- [15] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Rad Biol Med* **20**, 933–956 (1996)
- [16] N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, *Food Chem.*, **60**, 331-337, (1997)
- [17] Z. Sroka, W. Cisowski, *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 753-758 (2003)
- [18] S. Ou, K.C. Kwok, *J. Sci. Food Agric.*, **84**, 1261-1269 (2004)
- [19] R.W. Jiang, K.M. Lau, P.M. Hon., T.C.W. Mak, K.S. Woo, K.P. Fung, *Curr. Med. Chem.* **12**, 237-246 (2005)
- [20] Y.C. Xu, S.W.S. Leung, D.K.Y. Yeung, L.H. Hu, G.H. Chen, C.M. Che, R.Y.K. Man *Phytochemistry*, **68**, 1179-1188 (2007)
- [21] J. Robak, R.F. Gryglewski, *Pol. J. Pharmacol.*, **48**, 555-564 (1996)
- [22] K.M. Comar, D.F. Kirby, *J. Clin. Gastroenterol.*, **39**, 457-68 (2005)
- [23] B.P. Jacobs, et. al., *Am. J. Med.* **113**, 506-515 (2002)
- [24] C. Levy et. al., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 974-56 (2004)
- [25] C.A. Stace, *Taksonomia roślin i biosystematyka*, PWN, Warszawa, 1993
- [26] A. Szweykowska, J. Szweykowski, *Botanika*, PWN, Warszawa, 1993
- [27] J. Namieśnik, Z. Jamróiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, WNT, Warszawa 2000
- [28] R.J. Robbins, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2866-2887 (2003)
- [29] K. Krygier, F. Sosulski, L. Hogge, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 334-336 (1982)
- [30] E. Barcz, E. Rogala, G. Glinkowska, H. Strzelecka, E. Sikorska, I. Sokolnicka, E. Skopińska-Różewska, *Herba Pol.*, **44**, 45-51 (1998)
- [31] P.C. Santos-Gomes, R.M. Seabra, P.B. Andrade, M. Fernandes-Ferreira, *Plant Sci.*, **162**, 981-987 (2002)
- [32] K. Głowniak, G. Zgórk, M. Kozyra, *J. Chromatogr. A*, **730**, 25-29, (1996)
- [33] M. Waksmundzka-Hajnos, A. Oniszczuk, K. Szewczyk, D. Wianowska, *Acta Chromatogr.*, **19**, (2007)
- [34] C. Proestos, N. Chorianopoulos, G.-J.E. Nychas, M. Komaitis, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1190-1195 (2005)
- [35] M. Wójciak-Kosior, G. Matysik, E. Soczewiński, *J. Planar Chromatogr.*, **19**, 21-26 (2006)
- [36] D. Štěrbová, D. Matějíček, J. Vlček, V. Kubáň, *Anal. Chim. Acta*, **513**, 435-444 (2004)
- [37] M. Naczki, F. Shahidi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 1523-1542 (2006)
- [38] H.D. Smolarz, *Chem. Anal.*, **46**, 439-444 (2001)

- [39] G.A. Akowuah, Z. Ismail, I. Norhayati, A. Sadikun, Food Chem., **93**, 311-317 (2005)
- [40] K.E. Lage, J.T. Cothren, C.W. Smith, Environ. Exp. Bot., **35**, 241-249 (1995)
- [41] L. Świątek, Herba Polon., **23**, 201-210 (1977)
- [42] L. Świątek, E. Dombrowicz, Farm. Pol., **40**, 23, 729-732 (1984)
- [43] D. Ryan, H. Lawrence, P.D. Prenzler, Anal. Chim. Acta, **445**, 67-77 (2001)
- [44] S. Häkkinen, Doctoral dissertation, Department of Clinical Nutrition, Department of Physiology, Department of Biochemistry, University of Kuopio, Kuopio 2000
- [45] G. Zgórk, S. Kawka, J. Pharm. Biomed. Anal., **24**, 1065-1072 (2001)
- [46] A. Pieroni, D. Heimler, Y. Huang, J. Planar Chromatogr., **11**, 230-233 (1998);
- [47] G. Zgórk, K. Główniak, J. Planar Chromatogr., **26**, 79-87 (2001);
- [48] G. Janicsák, I. Máthé, V. Miklössy-Vari, G. Blunden, Biochem. Syst. & Ecol., **27**, 733-738, (1999);
- [49] G. Grygierczyk, M. Sajewicz, D. Staszek, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Annales, **21**, 37-43, 2008
- [50] „Extraction of Phenolic Acid from Plant Tissue Using Accelerated Solvent Extraction”, Application Note 357, Dionex, Sunnyvale, Kalifornia, USA)
- [51] D. L. Luthria, S. Mukhopadhyay, J. Agric. Food Chem., **54**, 41-47, (2006)
- [52] S. Mukhopadhyay, L. Luthria, R. Robinson, J. Sci. Food Agric., **86**, 156-162 (2006)
- [53] M. Waksmundzka-Hajnos, A. Oniszcuk, K. Szewczyk, D. Wianowska, Acta Chromatogr. **19**, 227-237 (2007)
- [54] „Farmakopea Polska VI”, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa, 2002
- [55] Z. Jerzmanowska, „Substancje roślinne. Meodyka wyodrębniania.” PWN, Warszawa, 1967
- [56] L. Świątek, Herba Polon., **3**, 23, 201-210 (1977)
- [57] T. Wolski et al. Rodzaj *Panax* – systematyka, skład chemiczny, działanie i zastosowanie oraz analiza fitochemiczna nadziemnych i oziemnych organów żeńszenia amerykańskiego – *Panax quinquefolium* L. Metody ekstrakcji i analizy związków fenolowych.” Cz. III. Postępy fitoterapii **4**, 207-224
- [58] K. Skalicka-Woźniak, „Badania związków biologicznie czynnych w owocach *Peucedanum alsaticum* L. i *Peucedanum cervaria* (L.) Lap., Praca doktorska, Lublin 2008
- [59] G. Zgórk, K. Główniak, J. Pharm. Biomed. Anal., **26**, 79-87, (2001)
- [60] A. Pieroni, D. Heimler, Y. Huang, J. Planar Chromatogr., **11**, 230-233 (1998)
- [61] M. Glensk, U. Sawicka, I. Mażol, W. Cisowski, J. Planar Chromatogr., **15**, 463-465 (2002)
- [62] M. A. Hawrył, M. Waksmundzka-Hajnos, J. Planar Chromatogr. **19**, 92-97 (2006)
- [63] M. Wójciak, A. Skalska, J. Planar Chromatogr., **19**, 200-203 (2006)
- [64] G. Janicsák, I. Máthé, V. Miklössy-Vári, G. Blunden, Biochem. Syst. & Ecol. **27**, 733-738 (1999)
- [65] G. Janicsák, I. Máthé, Chromatographia **46**, 322-324 (1997)
- [66] A. Koch, S. Basar, R. Richter, rozdz. 18 „Thin Layer Chromatography in Phytochemistry” (praca zbiorowa pod red. M. Waksmundzkiej-Hajnos, J. Shermey, T. Kowalskiej), CRC Press, Boca Raton, USA, 2008, str. 451-480
- [67] V. Bilušić Vundać et al., J. Planar Chromatogr., **18**, 269-273 (2005)
- [68] H. Wagner, S. Bladt, „Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1996
- [69] E. Reich, A. Schibli, A. DeBatt, J. AOAC Int., **91**, 13-20 (2008)
- [70] E. Soczewiński, G. Matysik, J. Liq. Chromatogr., **8**, 1225-1235 (1985)
- [71] K. Główniak, G. Matysik, M. Bieganowska, E. Soczewiński, Chromatographia, **22**, 307-310 (1986)
- [72] W. Cisowski, E. Lamer-Zarawska, J. Planar Chromatogr., **3**, 47-50 (1990)
- [73] W. Cisowski, E. Palka-Gudyka, M. Krauze-Baranowska, Z. A. Krolicki, J. Planar Chromatogr., **4**, 471-474 (1991)
- [74] G. Matysik, Chromatographia, **43**, 555-558 (1996)
- [75] I. Fecka, W. Cisowski, Chromatographia, **49**, 256-260 (1999)
- [76] E. Soczewiński, M. A. Hawrył, A. Hawrył, Chromatographia, **54**, 789-794 (2001)

-
- [77] M. A. Hawrył, A. Hawrył, E. Soczewiński, J. Planar Chromatogr., **15**, 4-10 (2002)
- [78] G. Matysik, Problemy optymalizacji chromatografii cienkowarstwowej, Akademia Medyczna w Lublinie 1997
- [79] I. Kivrak, M.E. Duru, M. Öztürk, N. Mercan, M. Harmandar, G. Topçu, Food Chem. **116**, 470-479 (2009)
- [80] Ž. Maleš, M. Medić-Šarić, J. Pharm. Biomed. Anal., **24**, 353-359 (2001)
- [81] K. Główniak, K. Skalicka, A. Ludwiczak, K. Jop, J. Planar Chromatogr., **18**, 264-268 (2005)
- [82] Z. Grodzińska-Zachwieja, W. Kahl, M. Klimczak, Dissert. Pharm. Pharmacol., **23** (1971)
- [83] M. Wettasinghe, F. Shahidii, R. Amarowicz, M. M. Abou-Zadi, Food Chem., **75**, 49-56 (2001)
- [84] V. Rastija, A. Mornar, J. Jasprica, G. Srečnik, M. Medić-Šarić, J. Planar Chromatogr., **17**, 26-31 (2004)
- [85] R. Kowalski, T. Wolski, J. Planar Chromatogr., **16**, 230-234 (2003)
- [86] J. Jończyk, „Kwasy fenolowe a chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej”, (pod red. B. Borkowskiego), PZWL, Warszawa, 1973
- [87] E. de Rijke et al., J.Chromatogr. A, **1112**, 31-63 (2006)
- [88] G. Matysik, M. Wójciak-Kosior, R. Paduch, J. Pharm. Biomed. Anal., **38**, 285-292 (2005)
- [89] S. B. Chen, et al., J. Chromatogr. A, **1121**, 114-119 (2006)
- [90] A. Jamshidi, M. Adjvadi, S.W. Husain, J. Planar Chromatogr. **13**, 57-59 (2000)
- [91] J. Opieńska-Blauth, H. Kraczkowski, H. Brzuszkiewicz, „Zarys chromatografii cienkowarstwowej”, Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1971
- [92] A. M. Medić-Šarić, I. Jasprica, A. Mornar, Ž. Maleš, rozdz. 16 „Thin Layer Chromatography in Phytochemistry” (praca zbiorowa pod red. M. Waksmundzkiej-Hajnos, J. Shermey, T. Kowalskiej), CRC Press, Boca Raton, USA, 2008, str. 405-423
- [93] P.H.C. Eilers, Anal. Chem. **76**, 404-411 (2004)
- [94] D. F. Thekkudan, S. C. Rutan, rozdz. 2 „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2009, vol. 2, str. 9-24
- [95] J. Trygg, J. Gabrielsson, T. Lundstedt, rozdz. 1 „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, vol. 2, 2009, str. 1-8
- [96] B. Walczak, D.L. Massart, TrAC, **16**, 451-463 (1997)
- [97] B. Walczak, D.L. Massart, Chemom. Intell. Lab. Syst., **36**, 81-94, (1997)
- [98] B. Walczak, “Wavelets in chemistry”, Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2000
- [99] S. Mallat, IEEE T. Pattern Anal., **11**, 674-693, (1989)
- [100] F.-T. Chau, Y.-Z. Liang, J. Gao, X.-G. Shao, „Chemometrics from basic to wavelets, Wiley, Hoboken, 2004
- [101] G. Malmquist, R. Danielsson, J. Chromatogr. A, **687**, 71-88 (1994)
- [102] N.-P.V. Nielsen, J.M. Carstensen, J. Smedsgaard, J. Chromatogr. A, **805**, 17-35 (1998)
- [103] B. Walczak, W. Wu, Chemom. Intell. Lab. Syst., **77**, 173-180 (2005)
- [104] A.M. van Nederkassel, M. Daszykowski, P.H.C. Eilers, Y. Vander Heyden, J. Chromatogr. A, **1118**, 199-210 (2006)
- [105] J. Forshed, I. Schuppe-Koistinen, S.P. Jacobsson, Anal. Chim. Acta, **487**, 189-199 (2003)
- [106] J.H. Jellema, rozdz. 6 „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, vol. 2, 86-108, 2009
- [107] V. Pravdova, B. Walczak, D.L. Massart, Anal. Chim. Acta, **456**, 77-92 (2002)
- [108] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Chemom. Intell. Lab. Syst., **2**, 37-52 (1987)
- [109] P. Gemperline, “Practical guide to chemometrics”, Taylor & Francis, Londyn, Wielka Brytania, 2006
- [110] D.L. Massart, Y. Vander Heyden, LC-GC Europe, **17**, 586-591 (2004)
- [111] D.L. Massart, Y. Vander Heyden, LC-GC Europe, **18**, 84-89 (2004)

- [112] M. Daszykowski, B. Walczak, „Chemometria w analityce” (praca zbiorowa pod red. D. Zuby, A. Parczewskiego), Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków, 2008
- [113] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, “Handbook of chemometrics and qualimetrics : part A”, Elsevier, Amsterdam, Holandia, 1997
- [114] R.W. Kennard, L.A. Stone, *Technometrics*, **11**, 137-148 (1969)
- [115] Y. Lu, Y. Foo, *Pchytochem.*, **59**, 117-140 (2002)
- [116] S.B. Chen, H.P. Liu, R.T. Tian, D.J. Yang, S.L. Chen, H.X. Xu, A.S.C. Chan, P.S. Xie, *J. Chromatogr. A*, **1121**, 114-119 (2006)
- [117] X.H. Fan, Y.Y. Cheng, Z.L. Ye, R.Ch. Lin, Z.Z. Qian, *Anal. Chim. Acta*, **555**, 217-224 (2006)
- [118] Y. Li, Z. Hu, L.He, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1667-1672 (2007)
- [119] A.H. Liu, Y.H. Lin, M. Yang, H. Guo, S.H. Guan, J.H. Guan, D.A. Guo, *J. Chromatogr. B*, **846**, 32-41 (2007)
- [120] M. Kivilompolo, T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A*, **1145**, 155-164 (2007)
- [121] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, *Free Rad Biol Med* **20**, 933-956 (1996)
- [122] A. Matkowski, M. Piotrowska, *Fitoterapia* **77**, 346-353 (2006)
- [123] E. Lamer-Zarawska, „Zioła w geriatrii”, ASTRUM, Wrocław, 1997
- [124] J.H.A.G. Niederlander, T.A. Van Beek, A. Bartasiute, I.I. Koleva, *J Chromatogr A* **1210**, 121-134 (2008)
- [125] B. Tepe, E. Donmez, M. Unlu, F. Candan, D. Daferera, G. Vardar-Unlu, M. Polissiou, A. Sokmen, *Food Chem.* **84**, 519-525 (2004)
- [126] I. Orhan, M. Kartal, Q. Naz, A. Ejaz, G. Yilmaz, Y. Kan, B. Konuklugil, B. Şener, M.I. Choudhary, *Food Chem.*, **103**, 1247-1254 (2007)
- [127] B. Tepe, *Biores. Technol.*, **99**, 1584-1588 (2008)
- [128] N. Neungchamnong, C.F. de Jong, B. Bruyneel, W.M.A. Niessen, H. Irth, K. Ingkaninan, *Phytochem. Anal.* **16**, 422-428 (2005)
- [129] Y.X. Chang, X.P. Ding, J. Qi, J. Cao, L.Y. Kang, D.N. Zhu, B.L. Zhang, B.Y. Yu, *J. Chromatogr. A*, **1208**, 76-82 (2008)
- [130] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **1000**, 963-984 (2003)
- [131] H.D. Bhattarai, B. Paudel, S.G. Hong, H.K. Lee, J.H. Yim, *Nat. Res. Lett.*, **62**, 481-484 (2008)
- [132] O.N. Pozharitskaya, S.A. Ivanova, A.N. Shikov, V.G. Makarov, *Phytochem. Anal.*, **19**, 236-243 (2008)
- [133] X.H. Fan, Y.Y. Cheng, Z.L. Ye, R.C. Lin, Z.Z. Qian, *Anal Chim Acta*, **555**, 217-224 (2006)
- [134] Y.Z. Liang, P. Xie, K. Chan, *J. Chromatogr. B* **812**, 53-70 (2004)
- [135] R. Langer, Ch. Mechtler, J. Jurenitsch, *Phytochem. Anal.*, **7**, 289-293 (1996)
- [136] N.A. Arikat, F.M. Jawad, N.S. Karam, R.A. Shibli, *Sci. Hort* **100**, 193-202 (2004)
- [137] X. Di, K.K.C. Chan, H.W. Leung, C.W. Huie, *J. Chromatogr. A*, **1018**, 85-95 (2003)
- [138] M. Gu, Z. Su, F. Ouyang, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **29**, 1503-1514 (2006)
- [139] Y.B. Ji, Q.S. Xu, Y.Z. Hu, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1066**, 97-104 (2005)
- [140] V. Katalinic, *J. Chromatogr. A*, **775**, 359-367 (1997)
- [141] L.C. Wang, Y.H. Cao, X.P. Xing, J.N. Ye, *Chromatographia*, **62**, 283-288 (2005)
- [142] X.F. Jin, Y.H. Lu, D.Z. Wei, Z.T. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 100-104 (2008)
- [143] M. Gu, G. Zang, Z. Su, F. Ouyang, *J. Chromatogr. A*, **1041**, 239-243 (2004)
- [144] S. Xu, L. Yang, R. Tian, Z. Wang, Z. Liu, P.S. Xie, Q. Feng, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 2163-2168 (2009)
- [145] G.H. Lu, K. Chan, Y.Z. Liang, K. Leung, Ch.L. Chan, Z.H. Jiang, Z.Z. Zhao, *J. Chromatogr. A*, **1073**, 383-392 (2005)
- [146] Ch. Chen, H. Zhang, W. Xiao, Z.P. Yang, N. Bai, *J. Chromatogr. A*, **1154**, 250-259 (2007)

- [147] G. Alaerts, N. Matthijias, J. Smeyers-Verbeke, I. Vander Heyden, J. Chromatogr. A, **1154**, 1–8 (2007)
- [148] M. Gu, S. Zhang, Z. Su, Y. Chen, F. Ouyang, J. Chromatogr. A, **1057**, 133–140 (2004)
- [149] Y. Sun, T. Guo, Y. Sui, F. Li, J. Chromatogr. B, **792**, 147–152 (2003).
- [150] L. Ma, X. Zhang, H. Zhang, Y. Gan, J. Chromatogr. B, **846**, 139–146 (2007).
- [151] Z. Shi, J. He, T. Yao, W. Chang, M. Zhao, J. Pharm. Biomed. Anal. **37**, 481–486 (2005)
- [152] N.C. Veitch, R.J. Grayer, J.L. Irwin, K. Takeda, Phytochemistry **48**, 389–393 (1998)
- [153] Y. Lu, K. Yu, H.B. Qu, Y.Y. Cheng, Chromatographia, **65**, 19–24 (2007)
- [154] Y.J. Wie, L.W. Qi, P. Li, H.W. Luo, L. Yi, L.H. Sheng, J. Pharm. Biomed. Anal., **45**, 775–784 (2007)
- [155] F. Dal Piaz, S. Imparato, L. Lepore, A. Bader, N. De Tommasi, J. Pharm. Biomed. Anal., **51**, 70–77 (2010)
- [156] Y. Zhao, B. Chen, S. Yao, J. Pharm. Biomed. Anal., **38**, 564–570 (2005)
- [157] R. Kocjan, Chemia analityczna: podręcznik dla studentów T2, PZWL, Warszawa
- [158] Z. Witkiewicz, “Podstawy chromatografii”, WNT, Warszawa, 2005
- [159] S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, Analítica Chimica Acta, **402**, 1–5 (1999)
- [160] Ł. Cieśla, M. Hajnos, D. Staszek, Ł. Wojtal, T. Kowalska M. Waksmundzka-Hajnos, J. Chromatogr. Sci., **48**, 421–427 (2010)
- [161] M. Daszykowski, M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, D. Staszek, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak, Acta Chromatogr., **21**, 513–530 (2009)
- [162] M. Daszykowski, B. Walczak, Trends Anal. Chem., **25**, 1081–1096 (2006)
- [163] D.L. Massart, L. Kaufman, The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis, R.E. Krieger, Florida, 1989
- [164] F.C. Sánchez, B. van den Bogaert, S.C. Rutan, D.L. Massart, Chemom. Intell. Lab. Syst., **34**, 139–171 (1996)
- [165] A. de Juan, R. Tauler, Anal. Chim. Acta, **500**, 195–210 (2003)
- [166] M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, Chemom. Intell. Lab. Syst., **65**, 97–112 (2003)
- [167] M. Daszykowski, B. Walczak, J. Chromatogr. A, **1176**, 1–11 (2007)
- [168] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. vander Werf, BCM Genomics, **7**, 142 (2006)
- [169] M.M.W.B. Hendriks, L. Cruz-Juarez, D. De Bont, R.D. Hall, Anal. Chim. Acta, **545**, 53–64 (2005)
- [170] S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak, „Comprehensive Chemometrics”, Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2009, vol. 2
- [171] <http://www.camag.com/tlc-ms>
- [172] M. Aranda, G. Morlock, J. Chromatogr. A, **1131**, 253–260 (2006)
- [173] H. Luftmann, M. Aranda, G. Morlock, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 3772–3776 (2007)
- [174] M. Aranda, G. Morlock, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 1297–1303 (2007)
- [175] M. Aranda, G. Morlock, J. Chromatogr. Sci., **45**, 251–255 (2007)
- [176] G. Morlock, U. Jautz, J. Planar Chromatogr., **21**, 367–371 (2008)
- [177] E. Dytkiewicz, G. Morlock, J. AOAC Int., **91**, 1237–1243 (2008)
- [178] M. Sajewicz, Ł. Wojtal, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. Planar Chromatogr.-Modern TLC, **23**, 270–276 (2010)
- [179] M. Sajewicz, Ł. Wojtal, M. Natić, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., **34**, 864–887 (2011).
- [180] “Sage – the Genus Salvia”. Kintzios, S. E., Ed.; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, Holandia, 2000.
- [181] S. Canigueral, J. Iglesias, M. Hamburger, K. Hostettmann, Planta Medica, **55**, 92 (1989)
- [182] S. Cui, B. Fu, F. Sen-Chun Lee, X. Wang, J. Chromatogr. B, **828**, 33–40 (2005)
- [183] P. Xie, S. Chen, Y.Z. Liang, X. Wang, R. Tian, R. Upton, J. Chromatogr. A, **1112**, 171–180 (2006)

-
- [184] L.W. Yang, D.H. Wu, X. Tang, W Peng, X.R. Wang, Y. Ma, W.W Su, J. Chromatogr. A., **1070**, 35–42 (2005)
- [185] S.B.Chen, H.P. Liu, R.T. Tian, D.J. Yang, S.L. Chen, H.X. Xu, A.S.C. Chan, P.S. Xie, J. Chromatogr. A, **1121**, 114–119 (2006)
- [186] R. Oprean, M. Tamas, R. Sandulescu, L. Roman, J. Pharm. Biomed. Anal., **18**, 651–657 (1998)
- [187] L. Komsta, Chromatographia, **73**, 721-731 (2011)

¹Institute of Chemistry, Silesian University

²Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin

GABRIELA GRYGIERCZYK¹, MIECZYŚLAW SAJEWICZ¹,
DOROTA STASZEK¹, ŁUKASZ WOJTAL¹,
MONIKA WAKSMUNDZKA-HAJNOS², TERESA KOWALSKA¹

Optimization of the double development mode by thin-layer chromatography applied to separation of the fraction of phenolic acids and flavonoids from the extracts of Salvia officinalis L.

Optymalizacja sposobu podwójnego rozwijania w chromatografii cienkowarstwowej zastosowanego do rozdzielania frakcji fenolokwasów i flawonoidów z ekstraktów szalwi lekarskiej (*Salvia officinalis* L.)

INTRODUCTION

Salvia officinalis L. folium is a commonly used plant material as antiseptic and adstringens drug. Moreover, it has antiviral, antihydroticum and antilactative properties. Because of its wide biological activity, the quality control is an important task for this plant drug.

Chromatographic studies of the plant extracts are connected with the chemical tests of herbal medicinal products from various points of view: their identity, composition, standardization, toxicity etc. Thin-layer chromatography plays an important role in the medicinal plant research as a rapid and low-cost method, enabling direct comparison of several samples simultaneously. It is also wide [3].

TLC can also be applied in a number of special development modes such, as multidimensional development, unidimensional multiple development (UMD), incremental multiple development (IMD), gradient multiple development (GMD), etc. [7]. All these methods improve resolution of the components, because each consecutive development results in band re-concentration and, thus, it enhances the efficiency of the separation [5, 7].

It was the aim of this study to demonstrate an impact of the development distance in the first development run, when applying the double development mode to the separation of the fraction of phenolic acids and flavonoids derived from the different samples of the medicinal plant sage (*Salvia officinalis* L.). This study was inspired by the article by Soczewiński et al. [6], also devoted to the application of the double development mode to phytochemical research.

EXPERIMENTAL DESIGN

SAMPLE PREPARATION

In the thin-layer chromatographic experiment we used dried leaves of the medicinal plant sage (*Salvia officinalis* L.). Two different commercial samples of the sage teabags were prepared by

the two manufacturers (further denoted as Manufacturer 1 and Manufacturer 2) and acquired from a local drugstore. Extracts from the sage leaves were prepared according to the procedure originally described by Pieroni et al. [4], although considerably modified in our laboratory. The main traits of our modification were (i) introducing two extractions of the plant material with *n*-hexane instead of one extraction recommended in [4]; and (ii) changing the sequence of the solvents used for the extraction (in our procedure, double extraction with *n*-hexane is made first and then it is followed by the extraction with chloroform).

An averaged sample of the dried and ground sage leaves (10 g) was in both cases obtained from a package of 30 sage teabags (each containing ca. 1.2 g dried leaves and making a total amount of ca. 36 g). Firstly, all the teabags were emptied onto a glass dish. Then the leaves were carefully mixed and a portion of 10 g was weighed. To this portion, 200 mL *n*-hexane was added, and the entity was placed in a round-bottomed flask and vortexed for 24 h at ambient temperature. Then the sage leaves were filtered and again extracted with *n*-hexane (100 mL), applying the same working conditions (in terms of duration and temperature) as before. Double extraction with *n*-hexane was meant to remove chlorophyll from the samples.

After evaporation of *n*-hexane, the filtered sage leaves were extracted with 100 mL chloroform, by placing the leaves and the solvent in the round-bottomed flask and vortexing its contents for 24 h at ambient temperature. The chloroform extract was evaporated to dryness and the obtained dry matter was treated with 10 mL methanol. The obtained solution was separated from an insoluble residue by centrifugation and then analyzed by means of thin-layer chromatography (TLC).

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)

The chromatograms were developed on the commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with the 0.25-mm thick silica gel 60 F₂₅₄ layer (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. #1.05715).

Extracts obtained from the two different sage batches were spotted on to the chromatographic plates in the aliquot of 5 µL spot⁻¹. On each plate eight extract samples were placed at the distance of 2 cm from one another, i.e., four samples of extract 1 and four samples of extract 2. The development was carried out in the ascending mode, using the classical Desaga chromatographic chambers (Heidelberg, Germany) prior to each of the two developments saturated for 30 min with the mobile phase vapors. The investigated extracts underwent the two-stage development. In the first development run, we used six chromatographic glass plates, each one developed to a different distance (2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm, and 7 cm). As a mobile phase, we used the ternary mixture composed of ethyl acetate – formic acid – water (85:15:0.5, v/v), denoted as a mobile phase 1 [6]. Then the chromatograms were dried for 2 h at ambient temperature and again they were developed to the distance of 15 cm with the ternary mixture of lesser elution strength than before, composed of dichloromethane – ethyl acetate – formic acid (85:15:0.5, v/v) and denoted as mobile phase 2 [6]. All the aforementioned experiments were repeated twice.

To better demonstrate the usefulness of the employed double development mode with the two ternary mobile phases of the different elution strength, we additionally developed the investigated sage extract samples to the distance of 15 cm, separately using the first and the second ternary mobile phase in the single development mode.

SCANNING DENSITOMETRY

The fingerprint densitograms were acquired with a Desaga Model CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software. Concentration profiles of the scanned lines were

recorded in UV light from the mercury lamp (in the reflectance mode) at 340 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm × 0.1 mm. The obtained concentration profiles are shown in Figs 1–4 and Fig. 6.

Different development distances in the first development run considerably affected an overall separation quality. To make a comparison of the final (i.e., obtained after the second development run) separations easier, we calculated the numerical values of resolution, R_s , given by the following relationship [2]:

$$R_s = \frac{z_2 - z_1}{0.5(w_1 + w_2)} \quad (1)$$

where z_1 and z_2 are, respectively, the distances from the start to the two neighbouring peak maxima (1 and 2), and w_1 and w_2 are the bottom-line widths of these profiles.

VIDEO DENSITOMETRY

The chromatograms were additionally scanned at the wavelength $\lambda = 254$ nm with the use of the Chromimage flatbed scanner (manufactured by AR2i, Le Plessis Robinson, France), to save the videoscans of the whole chromatograms; the selected examples are shown in Fig. 5.

RESULTS AND DISCUSSION

Examples of our experimental results in the form of the fingerprint densitograms are shown in Figs 1 and 2. These figures represent the scans recorded after the second development run, and yet they clearly mirror an impact exerted on an overall resolution by the different development distances in the first development run. In Tables 1 and 2, the calculated numerical values of resolution (R_s) for the neighbouring peaks from Figs 1 and 2 are given (labeled by the consecutive peak numbers).

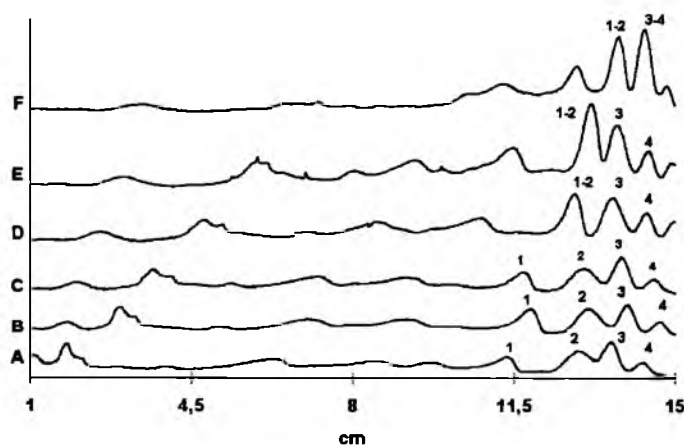


Figure 1. Densitograms of the chloroform extract of *Salvia officinalis* L. originating from Manufacturer 1. The development distance in the first run was equal to A – 2 cm, B – 3 cm, C – 4 cm, D – 5 cm, E – 6 cm, and F – 7 cm, and in the second run it was 15 cm

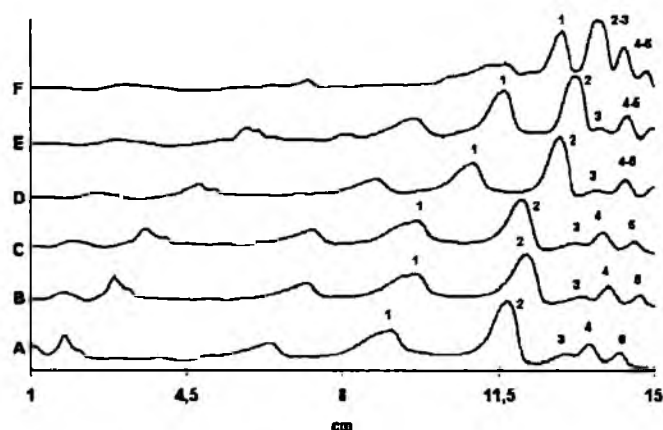


Figure 2. Densitograms of the chloroform extract of *Salvia officinalis* L. originating from Manufacturer 2. The development distance in the first run was equal to A – 2 cm, B – 3 cm, C – 4 cm, D – 5 cm, E – 6 cm, and F – 7 cm, and in the second run it was 15 cm

Table 1. Numerical values of resolution (R_s) for the chloroform extract of *Salvia officinalis* L. originating from Manufacturer 1. The column marked grey denotes the best separation obtained. The development length in the first run was equal to 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm, and 7 cm, and in the second run it was 15 cm

Pair of peaks	R_s					
	2cm	3cm	4cm	5cm	6cm	7cm
1–2	1.40	1.24	1.31	0.00	0.00	0.00
2–3	0.63	0.89	0.77	1.04	0.74	0.90
3–4	0.80	0.93	0.94	0.99	1.02	0.00

Table 2. Numerical values of resolution (R_s) for the chloroform extract of *Salvia officinalis* L. originating from Manufacturer 2. The column marked grey denotes the best separation obtained. The development length in the first run was equal to 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm, and 7 cm, and in the second run it was 15 cm

Pair of peaks	R_s					
	2 cm	3 cm	4 cm	5 cm	6 cm	7 cm
1–2	1.52	1.35	1.31	1.32	1.29	0.83
2–3	1.11	0.97	1.19	0.96	0.61	0.00
3–4	0.63	0.64	0.80	0.75	0.83	0.72
4–5	0.70	1.00	0.90	0.00	0.00	0.00

In Figs 3 a, b, for the sake of example, we showed the final (i.e. obtained after the second development run) montage videodensitograms corresponding to Figs. 1 and 2, respectively, for the two chloroform extracts of *Salvia officinalis* L. (originating from Manufacturer 1 and Manufacturer 2), in the first run developed to the distances of 2 cm, 3 cm, 4 cm, 5 cm, 6 cm, and 7 cm, and in the second run to the distance of 15 cm.

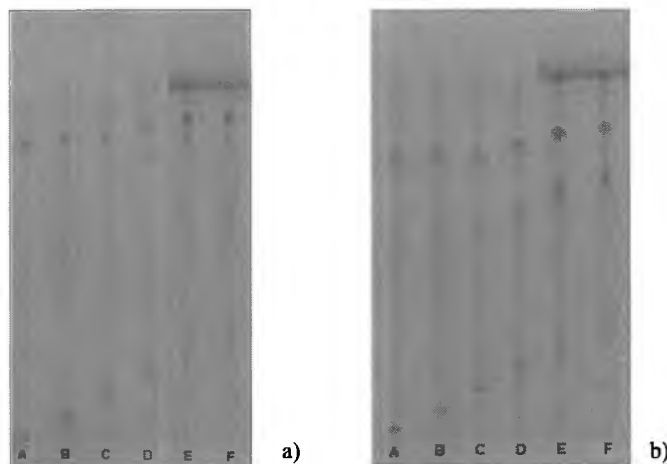


Figure 3. Montage videoscans of the chloroform extract of *Salvia officinalis* L. originating from (a) Manufacturer 1 and (b) Manufacturer 2, recorded at the wavelength $\lambda = 254$ nm. The development distance in the first run was equal to A – 2 cm, B – 3 cm, C – 4 cm, D – 5 cm, E – 6 cm, and F – 7 cm, and in the second run it was 15 cm

In Fig. 4. we showed the densitograms of extracts 1 and 2, separately chromatographed in the single development mode with mobile phase 1 (more polar) and mobile phase 2 (less polar). This additional experiment was meant to demonstrate (i) how important the right choice of the elution strength is in the case of a mixture of analytes differing in polarity and (ii) that multiple development (in our case, the simplest double development mode) can be a right practical solution of this “general chromatographic problem”. From the plots shown in Fig. 4 it appears that the elution strength of mobile phase 1 was too high and, as a result, hardly any decent separation was achieved. Instead, on the densitogram most extract components appeared too close to the front line. On the contrary, the elution strength of mobile phase 2 was too low and, as a result, the fingerprint profiles of the sage samples turned out too diffuse.

Visual inspection of the densitograms and the videoscans shown in Figs. 1–3 gives evidence of the following facts: (i) The fingerprint profiles of the chloroform extracts of the sage (*Salvia officinalis* L.) leaves originating from the two different plant batches apparently differ in quantitative terms (and probably in qualitative terms as well); (ii) The development distance in the first development run exerts a perceptible impact on the obtained fingerprint profiles.

A comparison of the numerical data presented in Tables 1 and 2 remains in a good agreement with the above statement. With the samples of the sage extract developed in the second run 15 cm high, the optimum resolution was obtained for the first run either 3 cm high (Manufacturer 1), or 4 cm high (Manufacturer 2).

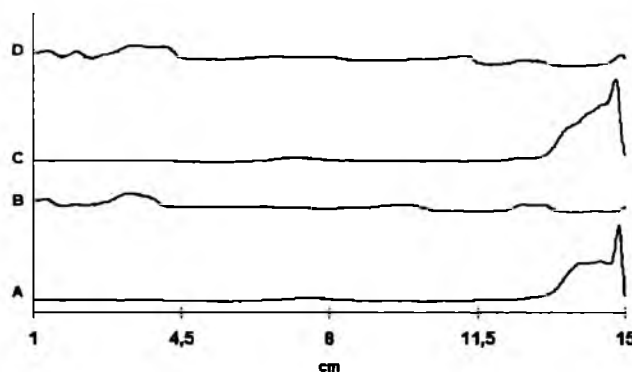


Figure 4. Densitograms of the chloroform extract of *Salvia officinalis* L. originating from Manufacturer 1 and 2. A – Manufacturer 1, mobile phase 1; B – Manufacturer 1, mobile phase 2; C – Manufacturer 2, mobile phase 1; D – Manufacturer 2, mobile phase 2. In all cases the development distance was 15 cm

CONCLUSIONS

On the basis of the obtained experimental results it can be stated that the double development mode (with the two mixed mobile phases of a different elution strength) proposed by Soczewiński et al. [6] can provide a successful separation of the fraction of phenolic acids and flavonoids contained in the extracts of *Salvia officinalis* L.

From visual inspection of the densitograms and from the numerical R_f values it can further be stated that even in the case of one botanical species, differences among the fingerprint layouts of the densitograms inherent of the different plant samples can be considerable. Thus it is rather impossible to in advance declare the optimum development distance in the first (and the second) development run. Hence, it is recommendable that the development distances are in each individual separation case optimized separately, for this purpose directly using the plant material of interest.

Acknowledgement. The authors wish to thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments. The authors wish to thank the AR2i Company (Le Plessis Robinson, France) for supplying the Chromimage video densitometer and the Galaxie-TLC software used in this study.

REFERENCES

1. Kholmünzer S.: Pharmacognosy (in Polish), Vth edition, PZWL, Warsaw 2003.
2. Kowalska T., Kaczmarek K., Prus W.: Theory and Mechanism of Thin-Layer Chromatography, Chapter II in: Handbook of Thin-Layer Chromatography (Eds J. Sherma, B. Fried), Marcel Dekker, New York 2003.
3. Nyiredy Sz., Główniak K.: Planar chromatography in medicinal plant research, in: Planar Chromatography (Nyiredy Sz. ed.), Springer, Budapest., pp.550, 2001.
4. Pieroni A., Heimler D., Huang Y.: A TLC method for separation and identification of flavones and flavone glycosides from biflavones in vegetable extract. J. Planar Chromatogr., 11, 230, 1998.

5. Poole C. F., Poole S. K., Fernando W. P. N. et al.: Multidimensional and multimodal Thin-Layer Chromatography: pathway to the future. *J. Planar Chromatogr.*, 2, 336, 1989.
6. Soczewiński E., Wójciak-Kosior M., Matysik G.: Analysis of glycosides and aglycones of flavonoid compounds by double-development thin-layer chromatography. *J. Planar Chromatogr.*, 17, 261, 2004.
7. Szabady B.: The different modes of development, in: *Planar Chromatography* (Nyiredy Sz. ed.), Springer, Budapest, pp. 88, 2001.

SUMMARY

In this paper we discuss an important issue of the development distance and the choice of eluents in the first and the second runs when using the double development mode of thin-layer chromatography (TLC). This mode is particularly well suited for the separation of the plant extracts carried out in phytochemistry when we intend to obtain the accurate fingerprint profiles of the sample composition with a mixture of analytes of different polarity. For the sake of example, we present an attempt on optimization of the development distance in the first development run upon an example of the two batches of the dried sage (*Salvia officinalis* L.) leaves originating from the two licensed sources and commercially distributed through the local drugstores. These two batches undergo an identical extraction procedure with chloroform and then the obtained extracts are double developed by means of TLC with two consecutive liquid ternary mixtures (eluent 1 and eluent 2) used for the separation of phenolic acids and flavonoids. The composition and sequence of these two eluents are taken from the literature. It is demonstrated that the difference in the fingerprint profiles of the fraction of phenolic acids and flavonoids originating from the different plant batches makes it virtually impossible to elaborate a general optimization procedure applicable to all *Salvia officinalis* L. samples. Instead, it is recommended that the optimization procedure is carried out for each given sage material separately.

STRESZCZENIE

W pracy przedyskutowano ważną kwestię dystansu i wyboru eluentów w pierwszym i drugim rozwijaniu, gdy zastosowano metodę podwójnego rozwijania w chromatografii cienkowarstwowej. Metoda ta jest szczególnie odpowiednia do rozdzielenia ekstraktów roślinnych w fitochemii, gdy zamierzamy uzyskać dokładny profil składu próbki (fingerprint) zawierającej mieszaninę analitów o zróżnicowanej polarności. Jako przykład prezentujemy próbę optymalizacji dystansu pierwszego rozwijania partii wysuszonych liści szalwi (*Salvia officinalis* L.) pochodzących z dwu licencjonowanych źródeł i rozprowadzanych handlowo przez lokalne apteki. Te dwa materiały roślinne zostały poddane identycznej procedurze ekstrakcji chloroformem i uzyskane ekstrakty były podwójnie rozwijane techniką TLC przy użyciu dwu następujących po sobie trójskładnikowych ciekłych mieszanin (eluentu 1 i eluentu 2), użytych do rozdzielenia kwasów fenolowych i flawonoidów. Skład i sekwencja użytych eluentów były wzięte z literatury. Pokazano, że różnica w „fingerprintowych” profilach frakcji kwasów fenolowych i flawonoidów roślin pochodzących z różnych źródeł czyni właściwie niemożliwym opracowanie ogólnej procedury optymalizacji do zastosowania dla wszystkich próbek szalwi, natomiast sugeruje się, że procedura optymalizacji powinna być przeprowadzana dla każdej partii szalwi oddzielnie.

TLC-Based Start-to-End Method of Analysis of Selected Biologically Active Compounds Contained in Common Sage (*Salvia officinalis* L.)

Gabriela Grygierczyk,¹ Mieczysław Sajewicz,¹ Dorota Staszek,¹
Łukasz Wojtal,¹ Monika Waksmundzka-Hajnos,² and Teresa Kowalska¹

¹Institute of Chemistry, Silesian University, Katowice, Poland

²Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin,
Lublin, Poland

Abstract: Common sage (*Salvia officinalis* L.) is an herb native to the Mediterranean region and nowadays is cultivated in many parts of the world. This plant has been known and utilized for hundreds of years in natural medicine, due to its curative properties and good performance in combating various diseases. In spite of its well recognized curative potential, the chemical composition of common sage is far from being sufficiently explored, and research is needed in the areas of phytochemistry and pharmacognosy to better scrutinize its constituents and therapeutic properties. It was the aim of this study to elaborate a start-to-end approach to extraction and chromatographic separation of the compounds contained in common sage, based on thin layer chromatography with densitometric detection and preparative layer chromatography, additionally supported by high performance liquid chromatography with diode-array detection and head-space gas chromatography with mass spectrometry detection. This approach was meant to enable an effective fingerprint analysis, focused mainly on flavonoids, phenolic acids, and terpenes, of the common sage samples, and its performance was demonstrated by analysis of a commercially available common sage tea preparation.

Keywords: Common sage, Flavonoids, HPLC/DAD, HS-GC/MS, Phenolic acids, *Salvia officinalis* L., Terpenes, TLC/densitometry

Correspondence: Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, Katowice, 40-006, Poland. E-mail: kowalska@us.edu.pl

INTRODUCTION

Common sage (*Salvia officinalis* L.) originates from the Mediterranean region, where it grows wild and is gathered from natural stands. It is also cultivated in Central and East European countries. Pharmacopoeial material consists of leaves and leaf tops of the sage sprouts with a determined content of essential oil (1.0–2.5% w/w). Essential oil of sage contains thujone, cyneol, camphor, borneol, pinene, and other components.^[1] Moreover, plant material contains diterpenes (carnosol, carnosolic acid, and rosmanol); triterpenes (oleanolic acid, ursolic acid, and germanicol); and catechine tannins and flavonoids, mainly the apigenine and luteoline derivatives.^[1]

Common sage has a long history of effective medicinal use, and it is an important domestic herbal remedy for disorders of the digestive system. Its antiseptic qualities make it an effective gargle for the mouth and gums, with an additional effect of pain relief.^[1] *S. officinalis* is reported to have a wide range of biological activities, i.e., anti-bacterial,^[2] fungistatic, virustatic,^[1,3] astringent, eupeptic, and anti-hydrotic,^[1,4] and anti-inflammatory.^[5] Water soluble polysaccharides from *S. officinalis* possess immunomodulatory activity,^[6] and there are also reports available on the hypoglycaemic effects of sage.^[7] Sage leaves are well known for their anti-oxidative properties^[8–11] and hence, they are used in the food processing industry. Moreover, sage has been recognized over the centuries as a restorative for lost or declining mental function,^[12–14] and for the antimutagenic activity of its extracts.^[15,16]

Essential oil from the sage leaves is used in perfumery, in hair shampoos, and as a food flavoring. It is a very effective perfume 'fixer', and it is used to flavor toothpastes and as an additive in bio-activating cosmetics.

Chromatographic methods are often used for examination and standardization of plant material derived from sage. In recent years, however, the principal attention of scientists has been focused on *S. miltiorrhiza* and on its active compounds, tanshinones. Published papers dealing with the liquid chromatography of *S. miltiorrhiza* are abundant, and applications of thin layer chromatography (TLC) are given in other articles.^[17,18] The volatile fraction of *S. officinalis* has often been examined by means of gas chromatography^[19–21] and TLC.^[22,23] Application of TLC to the separation and identification of diterpenes,^[24–26] flavonoids, and/or phenolic acids^[11,27] contained in sage has seldom been reported.

The aim of this research was to elaborate a start-to-end approach to extraction and chromatographic separation of the selected compounds contained in common sage (i.e., phenolic acids, flavonoids, and terpenes), based on thin layer chromatography with densitometric detection (TLC/densitometry) and preparative layer chromatography (PLC), additionally supported by high performance liquid chromatography with diode-array

detection (HPLC/DAD), and head-space gas chromatography with mass spectrometry detection (HS-GC/MS).

EXPERIMENTAL

Materials and Reagents

We used dried common sage leaves commercially available from drug-stores and suppliers of botanical nutritional supplements. An average sample of dried and ground common sage leaves (5 and 10 g) was obtained from a package of 30 sage teabags (each containing ca. 1.2 g of dried leaves and making a total amount of ca. 36 g). Firstly, all teabags were emptied into a glass dish. Then the leaves were carefully mixed, and portions of 5 and 10 g were weighed.

For extraction and liquid chromatography, chloroform, methanol, *n*-hexane, toluene, and 1,4-dioxane were used (all solvents were of analytical purity grade and manufactured by POCh, Gliwice, Poland). For identification purposes, we utilized solutions of standard phenolic acids and flavonoids listed in Table 1 (manufactured by the firm Roth, Karlsruhe, Germany).

Extraction

Traditional Extraction

Ten g of ground common sage leaves and 200 mL of *n*-hexane were placed in a round bottom reaction flask equipped with a reflux cooler, and the contents were vortexed for 24 h at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). The leaves were filtered, a fresh amount of 100 mL *n*-hexane was added, and, again, the contents were vortexed for 24 h at ambient temperature. *n*-Hexane extracts were discarded, as the aim of this extraction step was to remove chlorophyll from the sage sample (this natural pigment negatively affects further analysis due to its abundance and intensive color). The sage leaves were filtered, dried, treated with 100 mL of chloroform, and vortexed for 24 h at ambient temperature. The chloroform extract was evaporated to dryness in a stream of air. The obtained dry residue was dissolved in 10 mL of methanol and centrifuged.^[28] The decanted methanol solution was passed through an Anotop syringe filter, filled with aluminium oxide adsorbent (barrel diameter 25 mm, average particle diameter 0.02 μm ; Merck KGaA, Darmstadt, Germany, cat. no. 11320). The decanted and additionally filtered solution was ready for TLC analysis.

Table 1. The retardation factor (R_F) values for standard compounds used in TLC [stationary phase, silica gel; mobile phase, toluene – dioxane, 7:2 (v/v)]

Standard compound	R_F
Vanillic acid	0.48
Caffeic acid	0.21
<i>trans</i> -Cinnamic acid	0.54
Syringic acid	0.37
Rosmarinic acid	0.04
<i>m</i> -Coumaric acid	0.39
<i>o</i> -Coumaric acid	0.38
<i>p</i> -Coumaric acid	0.36
Chlorogenic acid	0
Gallic acid	0.24
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	0.16
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.19
Ellagic acid	0.10
Protocatechuic acid	0.23
Isovanillic acid	0.35
Ferulic acid	0.40
Apigenine	0.29
Luteoline	0.16
Myricetine	0.03
Quercetine	0
Quercitrine	0
Isoquercitrine	0
Rutine	0
Kaempferol	0.37
Hyperoside	0
Apigenine glucoside	0.27
Kaempferol glucoside	0
Luteoline glucoside	0.17
Hesperetine glucoside	0

Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Extraction was carried out according to the three different working procedures in an ASE 200 model accelerated solvent extraction unit (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The operating parameters valid for each individual procedure are given in Table 2.

Each extract obtained with use of the ASE apparatus was evaporated to dryness in a stream of air, and then 5 mL of methanol was added to the dry residue. Vials with dry residue and 5 mL of methanol were ultrasonicated for 15 min in a model RK 255H Sonorex Super ultrasonic bath

Table 2. The employed extracting solvents and working parameters of accelerated solvent extraction

No.	Extracting solvent	Sample weight (g)	Preheat (min)	Heat (min)	Static (min)	Pressure (atm)	Temperature (°C)	No. of cycles	Total time (min)	Total solvent volume (mL)
1	<i>n</i> -Hexane*	5	10	5	5	65	40	2	32	40 + 40
	(one cycle)									
	MeOH** (one cycle)		2	5	5		100			
2	MeOH	5	2	5	5	68	100	1	12	40
3	MeOH-H ₂ O, 8:2 (v/v)	5	10	5	5	65	40	1	20	40

**n*-Hexane extract was discarded, as the first extraction step was meant to eliminate chlorophyll from the sage samples.

**MeOH = methanol.

(Bandelin, Berlin, Germany). Finally, the contents of each vial were condensed by evaporation of the excess methanol to 1 mL. Extracts were filtered through an Anotop syringe filter with aluminium oxide adsorbent, and the samples were ready for liquid chromatographic analysis.

TLC/Densitometry

Thin layer separation of the sage extracts (traditional extract and the ASE extracts Nos. 1–3, listed in Table 2) was performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, cat. No. 1.05715). Each extract was spotted onto the thin layer in aliquots of 5 µL spot⁻¹ using an AS 30 model autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). Development of the chromatograms was carried out at 22 ± 2°C for a distance of 15 cm in the one-dimensional development mode, using the binary mobile phase toluene – dioxane (7:2, v/v). This mobile phase was our own modification of the ternary mobile phase proposed by Glensk et al.^[29] This modification consisted of removing formic acid from the mobile phase composition, which was the cause of an unfavorable solvent demixing. The chromatograms were dried for 3 h at ambient air and then evaluated by means of densitometry.

Acquisition of densitograms was carried out with a Desaga CD 60 model densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software (Desaga). Concentration profiles of the development lanes for the sage samples were recorded in reflected ultraviolet (UV) light from a deuterium lamp at 340 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm × 0.1 mm. The obtained densitograms were primarily assessed for providing the fingerprint response. The chromatograms were additionally scanned in 254 nm UV light using a Chromimage flatbed scanner (AR2i, Le Plessis Robinson, France).

PLC

A 40 µL aliquot of the ASE extract No. 1 (for details see Table 2) was applied to a preparative layer by means of the AS 30 model Desaga auto-sampler. Application was band-wise with a band width of 16 cm.

Preparative layer chromatographic separation of the investigated sage extracts was performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 2 mm layers of silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, cat. No. 1.05745). These separations were carried out using a procedure analogous to that employed in TLC, i.e., using the binary mixture toluene – dioxane (7:2, v/v) as the mobile phase. The plates were developed at 22 ± 2°C for a distance of 15 cm. Based on visual inspection, the area of the chromatogram was divided into five sections. Each section of the silica gel layer

was carefully scraped from the plate, mixed with 20 mL of methanol, and placed in an ultrasonic bath for 30 min. The ultrasonicated solution was passed through an Anotop syringe filter with aluminium oxide adsorbent in order to separate silica gel particles from the liquid, which was then evaporated to dryness in a stream of air. Dry residue from each fraction was dissolved in 1 mL of methanol, the obtained solution was again Anotop filtered, and 40 μ L aliquots were analyzed by means of HPLC/DAD.

HPLC/DAD

The HPLC/DAD analysis was carried out for the traditional extract, ASE extracts Nos. 1–3, and for the five individual fractions of the ASE extract No. 1, separated by means of PLC (in each case, a 40 μ L aliquot of the sample was used).

High performance liquid chromatographic analysis was carried out using a Gyncotek liquid chromatograph (Gyncotek, Macclesfield, UK) equipped with a Gyncotek Gina 50 model autosampler, Gyncotek P 580A LPG model pump, Gyncotek DAD UVD 340U model diode array detector, and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the isocratic mode, using an RP-18 (5 μ m particle size) column (250 mm \times 4.6 mm i.d.; Varian, Harbor City, CA, USA; cat. No. 1215–9307), and acetonitrile – water (55:45, v/v) mobile phase with a trace amount of glacial acetic acid (quantitative composition specially developed for the purpose of this analysis) at a flow rate of 0.6 mL min^{–1}.

HS-GC/MS

Gas chromatographic analysis additionally complemented our TLC-based strategy and was carried out for the 5 g samples of the dried sage leaves (without any preprocessing). The HS-GC/MS analysis was performed with use of a Trace 2000 model gas chromatograph with an MS Trace Finnigan model mass detector (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA); CTC Analytics model autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland); and DB-5, 30 m \times 0.25 mm i.d. column with film thickness 0.25 μ m (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The working parameters of the gas chromatograph were carrier gas, helium, p = 100 kPa; injector temperature, 150°C; ionization energy, 70 eV; and temperature program, 40°C (3 min), 40 to 150°C (8°/min), and isothermal conditions for 15 min at 150°C.

The autosampler was operated in the head space sampling mode. Working parameters of the autosampler were temperature of desorption,

70°C; time of desorption, 15 min; and amount of the head space phase introduced onto the gas chromatographic column, 0.5 mL.

For identification purposes, we additionally chromatographed ether oils of known composition, namely pine oil, peppermint oil, eucalyptus oil, and juniper oil, as sets of volatile standards (Apotheca Pacis, Rybnik, Poland), which enabled attribution of the retention times to the respective volatile compounds contained in sage. Identification of these compounds was based on agreement between retention times of the known components of the ether oil standards with those obtained from the sage, and on the comparison of mass spectra of the sage components with those from the NIST Mass Spectral Library with the Search Program in the HS-GC/MS system software.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction

At the first stage of our investigation, we focused on elaboration of the best performing extraction method to enable efficient analysis of the common sage samples by means of TLC/densitometry, PLC, and HPLC/DAD. On the basis of the obtained thin-layer chromatograms (see Figure 1), it became evident that the most efficient extraction technique was the two-step ASE procedure employing *n*-hexane and methanol as the extracting solvents, denoted as ASE extraction No. 1 in Table 2. Additional confirmation of this finding was derived from a comparison of the respective densitograms obtained for the four extracts considered, i.e., traditional extract and ASE extracts Nos. 1–3 (see Figure 2).

General advantages of the ASE extraction methods compared to the traditional one are the short time of running the extractions and relatively low consumption of solvents used (compare total extraction times and total consumption of solvents for the traditional approach and for those when using ASE, summarized in Table 2).

ASE extract No. 1, obtained according to the best performing procedure (see Table 2), was further analyzed by means of the liquid chromatographic techniques (TLC, PLC, and HPLC).

TLC/Densitometry

The main goal of the thin-layer chromatographic analysis with densitometric detection (apart from a comparison of the performance of the employed extraction procedures) was elaboration of the optimum working conditions for separation of the relatively high number of biologically

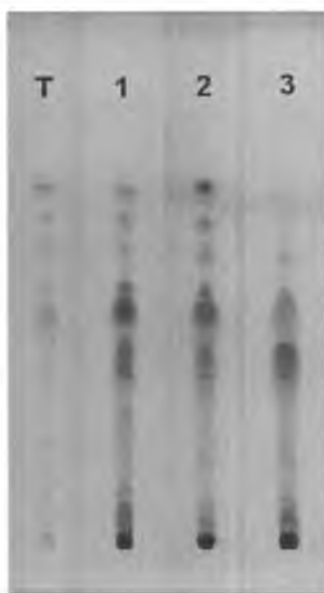


Figure 1. Chromimage scans of thin layer chromatograms of the analyzed common sage extracts, recorded at 254 nm. Stationary phase, silica gel; mobile phase, toluene – dioxane, 7:2 (v/v); sample aliquot, 5 μ L. T, extract obtained by traditional extraction; 1, ASE extract No. 1; 2, ASE extract No. 2; 3, ASE extract No. 3.

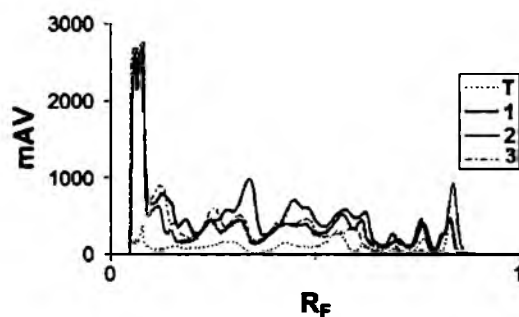
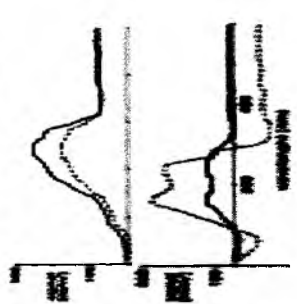


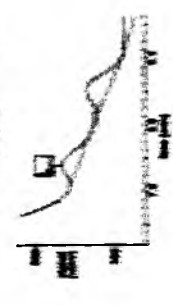
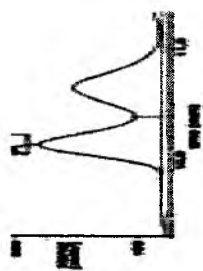


Figure 2. Densitograms obtained from the thin layer chromatograms of the common sage extracts at 340 nm, shown in Figure 1. Stationary phase, silica gel; mobile phase, toluene – dioxane, 7:2 (v/v); sample aliquot, 5 μ L. T, extract obtained by traditional extraction; 1, ASE extract No. 1; 2, ASE extract No. 2; 3, ASE extract No. 3.

Table 3. Summary of identified active compounds present in common sage as the respective HPLC chromatogram fragments with confirmatory UV spectra (HPLC/DAD) and in situ recorded UV spectra (TLC/densitometry). In densitometrically recorded UV spectra, a solid line denotes a spectrum collected from the sage chromatogram and a dashed line denotes a spectrum collected from standard sample

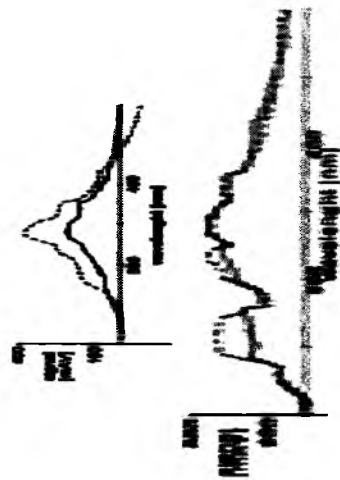
Compound	Instrumental evidence	
	HPLC/DAD	TLC/densitometry
Ferulic acid	not identified	
<i>o</i> -Coumaric acid		not identified
Caffeic acid		not identified
<i>l</i> -Cinnamic acid		not identified

Apigenine

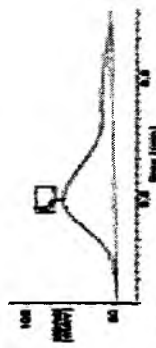


Apigenine glucoside

not identified

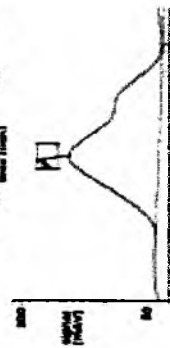


Rutine



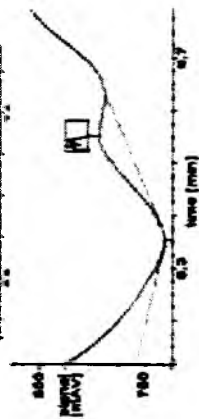
not identified

Kempherol



not identified

Myricetine



not identified

active compounds present in the sage samples for the purpose of fingerprint analysis.

In elaborating the most suitable thin-layer chromatographic conditions, we considered working systems recommended in the literature^[30–34] and applied them to the separation and identification of flavonoids and phenolic acids retrieved from plant material. Based on a considerable amount of our own test trials, we chose silica gel and toluene – dioxane (7:2, v/v) as the best system. With use of this system, we were able to get a fingerprint image showing at least 12 different compounds contained in the ASE extract No. 1 (see chromatogram 1 and densitogram 1, respectively, in Figures 1 and 2). In order to identify at least some of these compounds, we chromatographed selected flavonoids and phenolic acids as external standards. Comparing the retardation factor (R_F) values and densitometrically recorded UV spectra for the separated extract components and standard samples, we managed to identify the following compounds: ferulic acid, *o*-coumaric acid, apigenine, and apigenine glucoside. The R_F values of the standards of interest are given in Table 1, and the respective UV spectra are shown in Table 3.

HPLC/DAD

In Figure 3, we show the chromatogram obtained from the ASE No. 1 extract of the investigated common sage sample. As can be seen from Figure 3, due to an abundance of chemical compounds present in this extract and revealed by means of HPLC, the obtained chromatogram bears importance as a fingerprint. By comparison of the retention time (t_R) values and UV spectra of the extract components with those of the external standards listed in Table 1, we managed to identify several

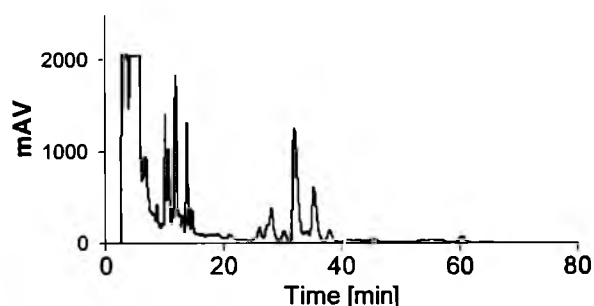


Figure 3. High performance liquid chromatogram of the ASE extract No. 1 of common sage recorded at 225 nm. Column, RP-18 (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m); mobile phase, acetonitrile – water, 55:45 (v/v), with the trace amount of glacial acetic acid.

phenolic acids: *o*-coumaric acid, caffeic acid, and *t*-cinnamic acid, and flavonoids: apigenine, rutin, kempherol, and myricetine. In Table 3, we show the enlarged fragments of the HPLC chromatogram together with the confirmatory UV spectra of the identified compounds.

PLC

As shown in the Chromimage scan of the preparative layer chromatogram (Figure 4a), upon visual inspection we divided the investigated sage

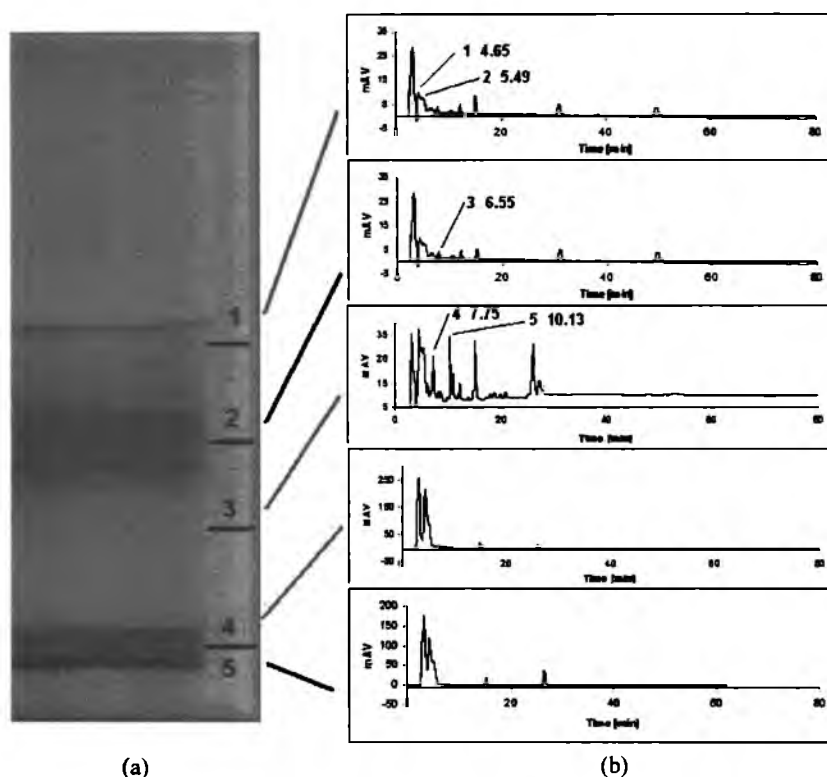


Figure 4. (a) Chromimage scan of the preparative layer chromatogram of the analyzed common sage extract (recorded at 254 nm) with the indicated five fractions; (b) Fingerprint comparison of the five high performance liquid chromatograms obtained from individual sections separated by PLC. Column, RP-18 (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m); mobile phase, acetonitrile – water, 55:45 (v/v), with the trace amount of glacial acetic acid. For the sake of example, peaks of the following identified compounds (and their respective retention times, t_R) are marked: 1, caffeic acid; 2, rutin; 3, myricetine; 4, *t*-cinnamic acid; and 5, apigenine.

extract into five fractions, which were retrieved from the five scraped out sections of the adsorbent layer. For the next step, 40 μ L aliquots of the methanol solutions of fractions 1–5 underwent examination by means of HPLC/DAD. Respective high performance liquid chromatograms of individual fractions are shown in Figure 4b. For the sake of an example, selected identified compounds (along with their respective retention times) are marked in this figure (i.e., caffeic acid, rutine, myricetine, *t*-cinnamic acid, and apigenine).

From a comparison of the chromatograms shown in Figure 4b as fingerprints, it is evident that individual fractions significantly differ both in qualitative and quantitative terms. Hence, it can be concluded that PLC is an important intermediary step, making further HPLC separation and identification of the sage extract composition a considerably easier and more efficient analytical task than analyzing the total extract.

HS-GC/MS

HS-GC/MS was a complementary analytical step employed in our study (and combined with the TLC-based strategy), basically due to the wealth of essential oils contained in common sage and to their recognized curative potential. Volatile organic compounds were retrieved from the plant sample and analyzed by means of HS-GC/MS. The aim of this experiment was identification of the volatile compounds, based on their retention times (Table 4) and mass spectra contained in the NIST Mass Spectral Library. In that way, 10 volatile organic compounds were identified in the sage sample: α -pinene, β -pinene, camphor, eucalyptol,

Table 4. Retention times (t_R) of the volatile organic compounds contained in common sage, determined by means of HS-GC/MS

Volatile compound	t_R (min)
α -Pinene	11.0
Camphene	11.5
β -Pinene	12.2
Eucalyptol	13.5
Thujonone	15.3
Camphor	16.3
Borneol	16.7
Bornyl acetate	18.8
Isocariophyllene	21.7
Cariophyllene	22.5

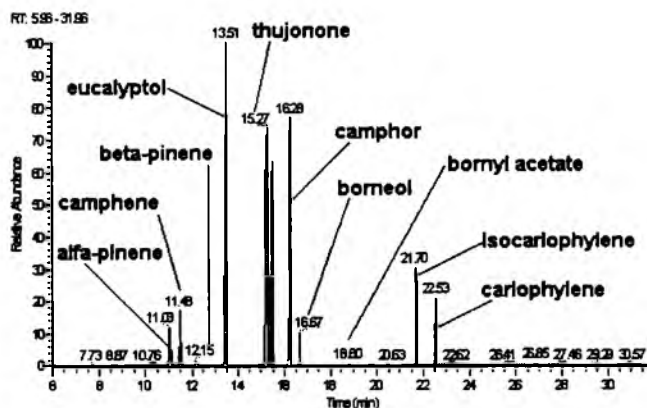


Figure 5. Head-space gas chromatogram of the common sage sample recorded by means of the HS-GC/MS system, with the volatile compounds identified with use of the NIST Mass Spectral Library.

borneol, bornyl acetate, camphene, thujonone, carlophyllene, and isocariophyllene (see Figure 5).

CONCLUSIONS

The following conclusions can be derived from our experiments:

- Two-step accelerated solvent extraction of plant material with *n*-hexane and methanol was more effective than traditional heating with a solvent under reflux.
- The thin-layer chromatographic system of choice (silica/toluene:dioxane, 7:2, v/v) could be applied to obtain a fingerprint profile of the common sage extract with 12 separated components and with ferulic acid, *o*-coumaric acid, apigenine, and apigenine glucoside identified by the retention parameters and UV spectra.
- A complementary HPLC profile enabled identification of *o*-coumaric acid, caffeic acid, *t*-cinnamic acid, apigenine, rutin, kempherol, and myricetin in the common sage extracts.
- PLC enabled isolation of five partly separated fractions, in which caffeic acid and rutin (fraction 1), myricetin (fraction 2), and *t*-cinnamic acid and apigenine (fraction 3) were identified. PLC was an important intermediary step, making further HPLC separation of the sage extract and identification of its components a much easier and more efficient analytical task than analyzing the total extract.

- A complementary method for fingerprint analysis of the volatile fraction derived from plant material was HS-GC/MS, which enabled identification of numerous terpenoids.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Merck KGaA (Darmstadt, Germany) for supplying the TLC plates used in our experiments.

REFERENCES

1. Kohlmünzer, S. *Pharmacognosy*, 5th Ed.; (in Polish). PZWL: Warszawa, Poland, 2003.
2. Longaray, D.; Ana, P.; Moschen-Pistorello, I.T.; Artico, L.; Atti-Serafini, L. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. in South Brasil. *Food Chem.* **2007**, *100*, 603–608.
3. Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.F.; Cotellet, P. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5053–5056.
4. Fang, R.S.; Badei, A.Z.M.A.; Hewedi, F.M.; El-Baroty, G.S.A. Antioxidant activity of some spices essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1989**, *66*, 792–799.
5. Baricevic, D.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharm.* **2001**, *75*, 125–132.
6. Capek, P.; Hribalova, V. Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry*. **2004**, *65*, 1983–1992.
7. Eidi, M.; Eidi, A.; Zamanizadeh, H. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharm.* **2005**, *100*, 310–313.
8. Grzegorzczak, I.; Matkowski, A.; Wysokinska, H. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chem.* **2007**, *104*, 536–541.
9. Li, Y.; Yeap, F.L. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* **2001**, *75*, 197–202.
10. Ollanketo, M.; Peltoketo, A.; Hartonen, K.; Hiltunen, R.; Riekkola, M.L. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *Europ. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 158–163.
11. Hohmann, J.; Zupko, I.; Redei, D. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their

- constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Med.* **1999**, *65*, 576–578.
12. Tidesley, N.T.J.; Kennedy, D.O.; Perry, E.K.; Ballard, C.; Savelev, S.; Wesnes, K.A.; Scholey, A.B. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *75*, 669–674.
 13. Tidesley, N.T.J.; Kennedy, D.O.; Perry, E.K.; Ballard, C.; Wesnes, K.A.; Scholey, A.B. Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiol. Behav.* **2005**, *83*, 699–709.
 14. Eidi, M.; Eidi, A.; Bahar, M. Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with cholinergic system in rats. *Nutrition.* **2006**, *22*, 321–326.
 15. Vukovic-Gacic, B.; Nikcevic, S.; Beric-Bjedov, T.; Knezevic-Vukcevic, J.; Simic, D. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Technol.* **2006**, *44*, 1730–1738.
 16. Filipic, M.; Baricevic, D. Antimutagenic activity of *Salvia officinalis* extracts against UV induced mutations in *E. coli* strains, *Mut. Res.* **1997**, *379*, S182–S183.
 17. Ren, Y.; Houghton, P.J.; Hider, R.C.; Howes, M.J.R. Novel diterpenoid acetylcholine-esterase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 201–204.
 18. Ryu, S.Y.; Lee, C.O.; Choi, S.U. In vitro cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.* **1997**, *63*, 339–342.
 19. Radulescu, V.; Chiliment, S.; Oprea, E. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*, *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1027*, 121–126.
 20. Pinto, E.; Salgueiro, L.R.; Cavaleiro, C.; Palmeira, A. In vitro susceptibility of some species of yeast and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Ind. Crops Prod.* **2007**, *26*, 135–141.
 21. Venskutonis, P.R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chem.* **1997**, *59*, 219–227.
 22. Kustrak, D.; Kuftinec, J.; Blazevic, N. Composition of essential oil and cytological investigation of sage species from Island of Vis. *Acta Pharm. Jugoslavia.* **1986**, *36*, 431–436.
 23. Pachaly, P. Leaves of sage and three-lobed leaves of sage. *Deutsche Apotheker Ztg.* **1990**, *130*, 169–170.
 24. Nagy, G.; Yang, M.H.; Günther, G.; Mathi, I.; Blunden, G.; Crabb, T.A. Danshenol-A and 15-epi-danshenol-A from the roots of *Salvia glutinosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 797–799.
 25. Ulubelen, A.; Birman, H.; Öksüz, S.; Topen, G.; Kolak, U.; Barla, A.; Voelter, W. Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 818–821.
 26. Xu, G.; Peng, L.; Lu, L.; Weng, Z.; Zhao, Y.; Li, X.; Zhao, Q.; Sun, H. Two new abietane diterpenoids from *Salvia yunnanensis*. *Planta Med.* **2006**, *72*, 84–86.

27. Exarchou, V.; Nenadis, N.; Tsimidou, M.; Gerothanassis, I.P.; Troganis, A.; Boskou, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5294–5299.
28. Grygierczyk, G.; Sajewicz, M.; Staszek, D.; Wojtal, Ł.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. On optimization of the double development mode applied to separation of the fraction of phenolic acids and flavonoids from the extracts of *Salvia officinalis* L. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska (Lublin, Poland), Sectio DDD Pharmacia.* **2008**, *21*, 37–43.
29. Glensk, M.; Sawicka, U.; Mażol, I.; Cisowski, W. 2D TLC – Graft planar chromatography in the analysis of mixture of phenolic acids. *J. Planar Chromatogr.* **2002**, *15*, 463–465.
30. Wójciak-Kosior, M.; Skalska, A. Thin layer chromatography of phenolic acids on aminopropylsilica. *J. Planar Chromatogr.* **2006**, *19*, 200–203.
31. Pieroni, A.; Heimler, D.; Huang, Y. A TLC method for separation and identification of flavones and flavone glycosides from biflavones in vegetable extract. *J. Planar Chromatogr.* **1998**, *11*, 230–233.
32. Janicsak, G.; Mathe, I.; Miklossy-Vari, V.; Blunden, G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of *Lamiaceae* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 733–738.
33. Hawrył, M.A.; Waksmundzka-Hajnos, M. Separation of phenolic compounds by NP and RP two-dimensional thin-layer chromatography on connected plates. *J. Planar Chromatogr.* **2006**, *19*, 92–97.
34. Zgórk, G.; Głowniak, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *J. Planar Chromatogr.* **2001**, *26*, 79–87.

Received October 27, 2008

Accepted November 6, 2008

Manuscript 6469C

Original Research Papers

Comparative Analysis of the Chromatographic Fingerprints of Twenty Different Sage (*Salvia* L.) Species

M. DASZYKOWSKI¹, M. SAJEWICZ², J. RZEPA², M. HAJNOS³, D. STASZEK²,
Ł. WOJTAL², T. KOWALSKA², M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS⁴, AND
B. WALCZAK^{1,*}

¹Department of Chemometrics, Institute of Chemistry, Silesian University,
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

²Department of General Chemistry and Chromatography, Silesian University,
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

³Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin,
1 Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

⁴Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin,
6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland

E-mail: beata@us.edu.pl

Summary. Comparative analysis of twenty different sage (*Salvia* L.) species grown in Poland has been performed on the basis of two types of chromatographic fingerprints. For efficient preprocessing and comparison of these fingerprints, chemometric methods were used. The main emphasis was on preprocessing of herbal fingerprints and selecting a suitable preprocessing strategy for exploring differences among them. After successful preprocessing of the fingerprints, principal component analysis was used to reveal chemical differences among the samples. An outcome of the comparative analysis was to pinpoint specific regions of the fingerprints indicative of differences among the samples. In fingerprints of the volatile fraction from the sage (*Salvia* L.) species, obtained from head-space gas chromatography coupled with mass spectrometry, important regions were identified and associated with the presence of camphene, limonene, and eucalyptol in these samples.

Key Words: background removal, chemometrics, comparative analysis, denoising, signal processing, sage (*Salvia* L.) species, HPLC fingerprints, HS–GC–MS fingerprints

Introduction

The genus *Salvia* is recognized around the world for having commercial, medicinal and cultural importance, mainly because of the useful essential oils produced by *Salvia* foliage [1, 2]. Several *Salvia* species have been cultivated as ornamental plants, or for their aromatic and aromatherapeutic properties, for confectionery, and as culinary herbs [3]. About thirty *Salvia* species grow naturally or are cultivated in Poland [4]. Medicinal applica-

tions of *Salvia* herbs are diverse, because of the different pharmacological activity of the species. Some are used as alimentary tract stimulators and digestion regulators, with additional antiseptic properties. Other *Salvia* species are known for their antipyretic, analgesic, and expectorant properties, and are readily applied in therapy of influenza and colds. Yet other species are used in therapy of psychoses, depression, and neuroses, because of the sedative properties of the respective decoctions. Application of sage against menstruation disorders has also been reported [5].

There has recently been substantial growth of interest in characterization of the chemical contents of a sample by use of its analytical signal, which is regarded as a sample fingerprint [6]. The use of fingerprinting strategies and methods is steadily attracting attention, e.g. for quality control of herbal medicines [6], in the petroleum industry [7], in biotechnology for peptide mapping [8, 9], or in tracing the origin of some products [10]. Among the different analytical techniques well suited to fingerprinting, chromatographic methods have their special place, because they enable separation and quantification of the components of the mixtures analyzed. For very complex samples (like those of natural origin), chromatograms (fingerprints) are often used for characterization and comparison, because of the high cost or the lack of chromatographic standards.

The task of comparative analysis of the samples represented by their chromatographic fingerprints can largely be facilitated by use of a variety of chemometric techniques, which include approaches that help to preprocess the chromatographic data [11], evaluate differences among the samples [12], estimate the number of components in a sample [13, 14], and visualize multivariate data [15].

For most applications, before further chemometric analysis, chromatographic fingerprints require some preprocessing to take their potential deficiencies into account. This step is very important, because it can hamper reaching overall conclusions about differences among the samples. Preprocessing of chromatographic fingerprints is a very challenging task and great care should be taken when a few preprocessing methods are used sequentially. Depending on the type of the sample and the technique selected, the fingerprints obtained contain different information. Therefore, preprocessing methods applied to chromatographic fingerprints ought to emphasize the underlying differences among the samples related to their chemical composition only, suppress undesired instrumental variations, and enhance the signal-to-noise ratio of the individual fingerprints.

In this paper, we focus on aspects of preprocessing of the chromatographic fingerprints of the twenty different sage (*Salvia* L.) species and on their comparative analysis. The comparative analysis is performed for two sets of fingerprints. The first set of fingerprints was obtained by use of high-

performance liquid chromatography (HPLC), the second by use of head-space gas chromatography with mass spectrometric detection (HS-GS-MS). It is revealed that – depending on the quality of the fingerprints – they may require different preprocessing (e.g., baseline correction, denoising, signal alignment, etc.). For preprocessing and comparative analysis, the optimum set of chemometric approaches was selected and used.

Theory

In this section, we provide a short description of methods suitable for preprocessing and comparative analysis of chromatographic fingerprints. Fingerprints usually require background and noise removal, and peak alignment before comparative analysis.

Background Elimination

Many different approaches can be used to remove the background component from analytical signals; these include the penalized asymmetric least-squares, PALS, approach proposed by Eilers [16]. It is an iterative procedure, in which a signal baseline, \mathbf{b} , is fitted to the signal, \mathbf{x} , in a least-squares sense. The key assumption is that each point of a signal has a different weight. In the course of procedure, these weights are modified so that the points above an approximated baseline receive very small weights, and otherwise the weights are close to 1. The objective function, Q , minimized during the iterative procedure, can be expressed as:

$$Q = \sum_{i=1}^n w_i (x_i - b_i)^2 + \lambda (\Delta^d b_i)^2 \quad (1)$$

where w_i are weights, λ is the so-called penalty term, d denotes the order of differences Δ , and n is the number of sampling points in a signal.

Two input quantities should be optimized – the order of differences and the penalty term. In most applications satisfactory baseline approximations are obtained when $d = 2$. The penalty term, which weighs the second term of eq. (1), is intended to control the smoothness of the signal baseline. The larger the values of λ , the smoother the baseline obtained.

Elimination of Noise from Analytical Signals

To suppress white (Gaussian) noise in analytical signals, different types of digital filters can be used either in time or in the frequency domain [17, 18], e.g., moving-average, Savitsky–Golay filters, etc. Recently, denoising of chromatographic signals by use of wavelets has attracted much attention, because this approach can efficiently deal with white noise in non-stationary signals [19–21]. Chromatograms are typical examples of such instrumental signals, because they contain components of very different frequencies.

The wavelet transform operates on a single analytical signal, \mathbf{x} , and it linearly transforms this signal from its original domain to the wavelet domain. Wavelets are a set of specific functions or basis vectors with orthogonal and local properties. For this reason wavelets have much potential to model different signal components and enable a signal to be studied at its different resolution levels. In the wavelet domain, each signal is described by a set of the so-called wavelet coefficients, \mathbf{c} :

$$\mathbf{c} = \mathbf{W}^T \mathbf{x} \quad (2)$$

where \mathbf{W} is a matrix that contains the basis vectors in columns, and \mathbf{x} is an analytical signal.

Processing of instrumental signals in the wavelets domain can be computationally very efficient when the so-called pyramid algorithm is used. However, this algorithm can only deal with signals of length equal to an integer power of two [22]. Several approaches can be used to adjust signals to a desired length. The signals are then decomposed in several consecutive steps. The time domain of a signal is recursively cut into halves using a low-pass filter and a high-pass filter until only one point remains in the processed signal [23]. At each decomposition level, two sets of wavelet coefficients are obtained, i.e. $n/2$ of the low-frequency coefficients (the so-called approximations) and $n/2$ of the high-frequency coefficients (the so-called details). Details obtained from the first level decomposition of a signal can support estimation of its noise level. For this purpose, two available thresholding policies (soft and hard) and several threshold criteria can be used. On this basis it is possible to determine and eliminate the details representing signal noise [21]. After removal of these details, the signal is transformed back in the time domain, eventually resulting in a noise-free signal.

Alignment of Instrumental Signals

Before chemometric analysis, chromatographic signals must usually be aligned [24]. Chromatographic techniques, especially high-performance liquid chromatography (HPLC), are vulnerable to different sources of instrumental variations, usually caused by column ageing phenomena, changes in mobile phase composition, difficulties in reproducing the same gradient conditions and the same temperature in the course of analysis, etc. Such difficulties are often encountered, when a large-scale experiment is launched, and analysis of samples is performed over a long period of time. This can result in peak shifts along the time axis, and thus when pairs of chromatograms are compared, peaks of the same component do not match. To overcome the peak-shift problem, many alignment techniques have been proposed [16, 25–30]. Their objective is to match corresponding peaks across a set of chromatograms. Alignment of instrumental signals is not a trivial task, because correspondence of peaks is unknown. Otherwise, one could relatively easily match the peaks between the corresponding points in the pairs of signals (a target and a signal being aligned) by means of linear interpolation. As shown in the literature, correlation optimized warping (COW) [25] seems a frequent method of choice in a variety of alignment applications. Practically, COW has a very appealing feature – no assumptions about the signals are required. Using the COW method, peaks in a signal, P , are matched with their counterparts in the target signal, T . To accomplish the alignment, piecewise linear stretching and compression of signal P is performed so that the correlation coefficient between signals P and T is maximized. In the COW approach, two input variables, the section length, N , and the so-called slack variable, denoted t , control the quality of the alignment. Initially, chromatograms P and T are divided into N sections, each with its start and end points. Sections in signal P are then warped by changing the positions of the end points. When $t = 1$, each end point of a section can have three possible locations: $[-1, 0, 1]$. This notation means, respectively, that a given section is shortened by one point, the section length remains unchanged, and the section is made one point longer. A detailed presentation of the COW algorithm can be found elsewhere [25].

Principal Component Analysis

The objective of principal component analysis is to represent the structure of data using a set of a few new variables called principal components, PCs [31]. They are linear combinations of the original data variables that maximize description of data variance. Principal components are orthogo-

nal vectors, and thus each consecutive PC models a part of the information not explained by its predecessors. The PCA model with f principal components, constructed for any data matrix $X(m \times n)$, can be represented as:

$$X = TP^T + E \quad (3)$$

where $T(m \times f)$ is the matrix of scores, $P(n \times f)$ is the matrix of loadings, $E(m \times n)$ is the residual matrix, containing information that was not modelled using the PCA model with f principal components, and superscript T denotes transposition of the matrix.

In the course of running PCA, the original data are decomposed into a set of scores and loadings which can be used to visualize and interpret the data structure. Therefore, the set of scores and loadings can also be regarded as a new coordinate system. The score plots (constructed as projections of samples on to the plane defined by selected pairs of PCs) enables study of similarities among the samples, whereas the loading plots (representing the projections of the variables on the planes of selected PCs) give information about contribution of individual data variables to a given PC. When two samples are similar chemically, they are also close to each other on the score plot. High similarity between two experimental variables is manifested on a loading plot by a small angle between the two vectors of weights. Their starting points are located at the origin of a principal components system whereas their end points are defined by the corresponding weight values for a selected pair of PCs.

Experimental

Plant Material

Samples of the twenty different sage (*Salvia* L.) species investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in August, 2007. Botany specialists identified each species and voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University, Lublin. The sage species investigated are listed in *Table I*. Plant material was dried at 35 to 40°C for 40 h in an oven with forced air flow and the dry material obtained was stored under refrigeration until required for analysis.

Table I. The sage (*Salvia* L.) species investigated

No.	Name
1	<i>S. azurea</i>
2	<i>S. lavandulifolia</i>
3	<i>S. verticillata</i>
4	<i>S. pratensis</i>
5	<i>S. staminea</i>
6	<i>S. deserta</i>
7	<i>S. cadmica</i>
8	<i>S. forskahlei</i>
9	<i>S. sclarea</i>
10	<i>S. canariensis</i>
11	<i>S. hians</i>
12	<i>S. triloba</i>
13	<i>S. glutinosa</i>
14	<i>S. nemorosa</i>
15	<i>S. tesquicola</i>
16	<i>S. amplexicaulis</i>
17	<i>S. atropatana</i>
18	<i>S. stepposa</i>
19	<i>S. jurisicii</i>
20	<i>S. officinalis</i>

Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Compounds of interest (flavonoids and phenolic acids) were extracted from the plant material by use of Dionex (Sunnyvale, CA, USA) ASE 200 equipment. Each sage species (5 g) was weighed, powdered in a porcelain mortar, and placed in the cell of the accelerated solvent extraction (ASE) unit. We used a two-step extraction procedure. In the first step, sage samples were extracted for 20 min with *n*-hexane at 40°C, to remove chlorophyll from the foliage, and the *n*-hexane extract was discarded. In the second step, the same sage samples were extracted for 12 min with methanol at 100°C. Both extraction steps were performed at a pressure of 65 atm.

Each extract was evaporated to dryness in a stream of air, then 5 mL methanol was added to the dry residue and the mixture was ultrasonicated for 15 min in a model RK 255H Sonorex Super ultrasonication bath (Bandelin, Berlin, Germany). Finally, the contents of each vial were concentrated to 1 mL by evaporation of excess methanol. Extracts were filtered through an Anotop syringe filter with aluminium oxide adsorbent (Merck #11320) and the samples were ready for liquid chromatographic analysis. The amount analysed was 40 µL.

High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD)

HPLC was performed with a Gyncotek (Macclesfield, UK) liquid chromatograph equipped with the Gyncotek Gina 50 autosampler, the Gyncotek P 580A LPG pump, the Gyncotek UVD 340U diode-array detector (DAD), and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. Compounds were separated on a 250 mm \times 4.6 mm i.d., 5- μ m particle, RP-18 column (Varian, Harbor City, CA, USA; #1215-9307) with acetonitrile-water 55:45 (*v/v*), containing a trace amount of glacial acetic acid, as isocratic mobile phase. The flow rate was 0.6 mL min⁻¹. The quantitative composition of the mobile phase was specially developed for the purpose of this analysis).

Development of the ASE procedure used for plant extraction followed by HPLC-DAD acquisition of the sage fingerprints has been described in detail elsewhere [32].

Head-Space Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection (HS-GC-MS)

Each sage species (1 g) was weighed, powdered in a porcelain mortar, and placed in a 10-mL glass vial stoppered with a Teflon-faced silicone rubber septum. Three replicates of each sample were processed identically. HS-GC-MS analysis was performed with a Trace 2000 gas chromatograph, an MS Trace mass detector (both from ThermoQuest, Waltham, MA, USA), and a CTC Analytics autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland), used in the head-space mode. Temperature and time of head-space desorption were, respectively, 70°C and 15 min. The head-space phase (0.5 mL) was introduced into a 30 m \times 0.25 mm i.d. capillary column coated with a 0.25- μ m film of DB-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA; formerly J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium (*p* = 100 kPa) was used as carrier gas. The column temperature was maintained at 40°C for 3 min, then programmed at 8° min⁻¹ to 150°C, which was maintained for 15 min. The injector temperature was 150°C.

The mass spectrometer was fitted with an EI source operated at 70 eV. Identification of individual compounds was based on comparison of mass spectra obtained from sample components with those from standards or available from the NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) software library. Retention times of peaks from the *Salvia* samples were also compared with those of known components of other essential oils. For this purpose we used pine oil, peppermint oil, euca-

lyptus oil, and juniper oil (Apotheca Pacis, Rybnik, Poland) as the sets of the volatile standards [33].

Results and Discussion

In our study, two sets of herbal fingerprints of the *Salvia* species were processed and compared using chemometric methods. Chemometrics has many approaches that can be used to explore and to evaluate differences among chromatographic fingerprints. Irrespective of the method used, proper signal preprocessing is crucial for the further comparative and exploratory analysis. Preprocessing of instrumental signals is performed to meet three objectives:

- (i) to enhance signal quality;
- (ii) to make the signal analysis possible; and
- (iii) to enhance interpretation of the final results.

These objectives are usually accomplished in four consecutive steps of signal preprocessing and in the next sections they are discussed in detail.

Step 1: Preliminary Preparation of Chromatographic Fingerprints

The first step of signal preprocessing can be regarded as a preliminarily step. At this stage, individual fingerprints are prepared to make further preprocessing possible. For example, adjustment of the length of the chromatograms and/or removal of uninformative parts can prove necessary; this was necessary for the herbal fingerprints studied in this work.

With the analyzed HPLC fingerprints, different acquisition rates were used from one sample to another. In that way, peaks were better shaped but the time axis of the chromatograms is not uniformly sampled. As a consequence, within each time interval the number of the data points is different. The length of the analyzed HPLC chromatograms varied between 4380 and 10 859 sampling points. To organize these data into a matrix, it is obligatory to record all chromatograms within the same time interval and sample their time axis at the same points. To take uneven sampling of the time axis into account, signal intensities measured at the points of the original time axis can be linearly interpolated to the points of a new time axis that are uniformly distributed over the entire time range; this was done for the HPLC fingerprints studied.

To illustrate this, Fig. 1a shows the original chromatogram of sample 12 (extract of *S. triloba*), divided into twenty time intervals of 4 min each. In each time section, the number of the sampling points was determined and is visualized in Fig. 1b.

From this figure, it can easily be understood that each section consists of a different number of sampling points. In terms of the number of points, the width of individual sections can be relatively large, and range from 110 to 2048 sampling points. As shown in Fig. 1c, linear interpolation enables adjustment of the acquisition rate and, finally, each section has the same number of sampling points.

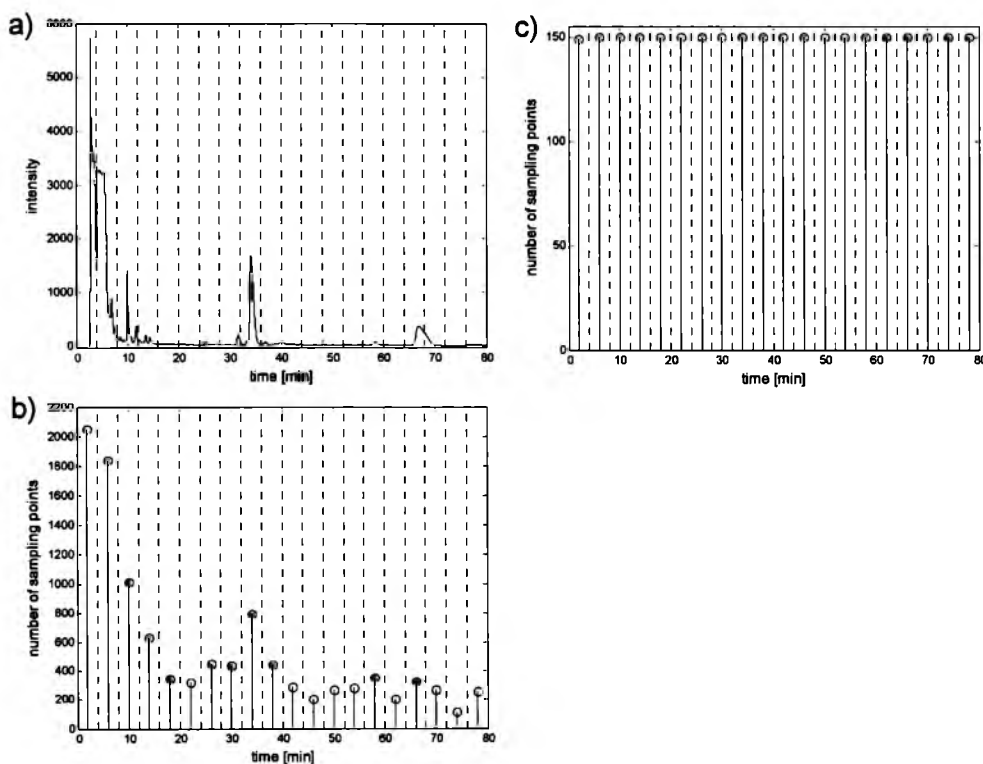


Fig. 1. (a) Original HPLC chromatogram of sample 12 (extract of *S. triloba*) divided into twenty time sections of 4 min each; (b) number of sampling points in each time window; (c) number of points in each time window after linear interpolation of a signal to a length of 3000 sampling points

Moreover, linear interpolation preserves the peak shapes. It seems the best option to adjust the number of points on the new time axis in accordance with the shortest chromatogram. Linear interpolation can also be used to reduce the length of a chromatogram. Very often, the number of the data points in a chromatogram can be much reduced, virtually without any

loss of its information content, thus considerably reducing the computational effort necessary to preprocess the signals. Such a signal preprocessing is, therefore, frequently used before signal alignment, for instance using the COW algorithm [25]. On the other hand, when chromatograms require denoising, linear interpolation to adjust their lengths cannot be used, because this operation affects noise characteristics.

Coming back to processing our collection of the HPLC fingerprints, it is relevant to stress that all have a satisfactory signal-to-noise ratio. Therefore, noise elimination proved unnecessary, yet the fingerprints were of different length. Bearing in mind a satisfactory signal-to-noise ratio, fingerprint lengths were adjusted using linear interpolation. After this transformation, the longest chromatogram (chromatogram 12; extract of *S. triloba*) was compressed by a factor of approximately 3.6 (from 10 859 to 3000 sampling points). As shown in Fig. 2b, important signal details relevant to the problem studied were still present after compression.

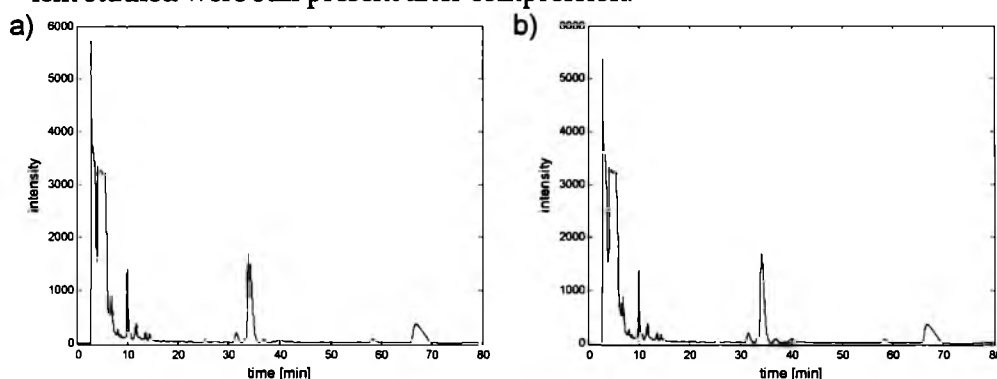


Fig. 2. HPLC chromatogram obtained from *S. triloba* extract (sample 12) before (a) and after (b) linear interpolation reducing the number of sampling points from 10 859 to 3000

The objective of another type of initial fingerprint preprocessing is to remove uninformative regions from the signals. For example, peaks that are not expected to explain variability among the samples should be removed. An uninformative region between 0 and 8.5 min, where the predominant signals were from carbon dioxide and oxygen, was therefore removed from all HS-GC-MS fingerprints.

Step 2: Enhancement of Signal-to-Noise Ratio for Chromatographic Fingerprints

In the second preprocessing step, we concentrated on enhancement of the signal-to-noise ratio of the herbal fingerprints. To remove the background from these fingerprints and to suppress noise, the penalized asymmetric

least-squares (PALS) method and the wavelet transform, respectively, were used. Except for signal 10, the penalty term used for all the HS-GC-MS fingerprints in the PALS method was set to 10^5 . For signal 10 it was 10^3 . As an illustration of background removal using the PALS method, first let us consider the HS-GC-MS fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea*, shown in Fig. 3a.

It is apparent that the fingerprint obtained requires offset and background corrections, because these two components substantially contribute to the overall signal intensity. Fig. 3b shows the chromatographic fingerprint of *S. azurea* without the offset and background, and Fig. 3c shows the estimated background profile, obtained by use of the PALS method. Background elimination was necessary for all the chromatographic fingerprints studied, but only for the HS-GC-MS fingerprints was the noise level substantial. Therefore, these fingerprints were further preprocessed using the wavelet transform, implemented in MATLAB and freely available from Ref. [34]. The wavelet basis and decomposition level were optimized. The symmelet wavelet (with five vanishing points) was applied as a mother

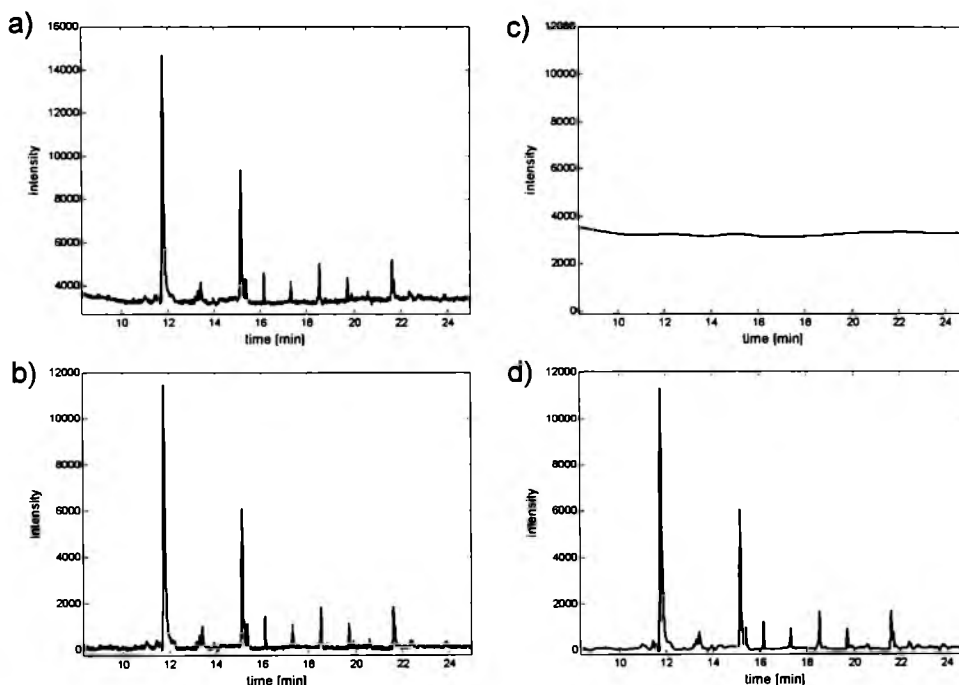


Fig. 3. (a) Original HS-GC-MS fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea*.

(b) The same fingerprint after removal of its background component.

(c) The estimated background profile using the penalized asymmetric least-squares

method. (d) Fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea* after background elimination and noise reduction using the wavelet transform

wavelet, and the decomposition level was set to two. To remove irrelevant details, the 'Visu' criterion and the soft thresholding policy were used. Fig. 3d shows the HS-GC-MS fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea* after denoising by use of the wavelet transform.

Step 3: Alignment of Chromatographic Signals

The HPLC fingerprints obtained from the extracts of *S. azurea* and *S. sclarea*, shown in Fig. 4a, illustrate the peak-shift problem in HPLC data. The same is true for the HS-GC-MS fingerprints, so both sets of fingerprints require alignment. These sets were aligned by use of the COW method, implemented in the freely available MATLAB toolbox [35]. Initially, for each fingerprint type, the target signal was selected on the basis of the correlation coefficient criterion. As target signal, that with the highest mean correlation coefficient among all the considered signals was selected [36] and further used to align the remaining signals. Then, for each group of fingerprints, warping variables were optimized. With the HPLC fingerprints, each signal was divided into 120 sections and the slack variable was set to 5. With the HS-GC-MS fingerprints, the optimum alignment was obtained when signals were divided into 90 sections and the slack variable was set to 5.

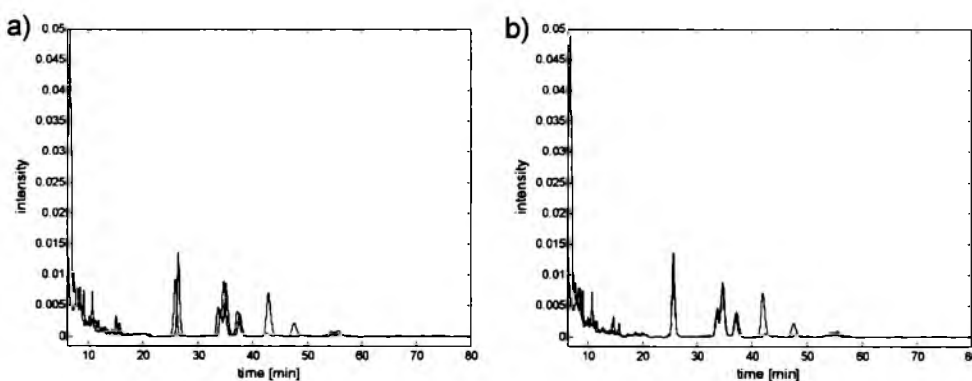


Fig. 4. Two superimposed HPLC fingerprints of samples 1 and 9 (extracts of *S. azurea* and *S. sclarea*.) before (a) and after (b) their alignment using the correlation optimized warping

To demonstrate the effect of signal alignment, let us consider the pair of chromatographic fingerprints shown in Fig. 4a. Although the samples of the herbal extracts studied tended to differ substantially in their chemical composition, from Fig. 4b it is evident that, using the COW method, two fingerprints were aligned satisfactorily.

Step 4: Normalization

To take other deficiencies of the assessed herbal fingerprints into account, the last step of preprocessing was executed and the additional data transformations were applied. For chromatographic signals similar to those discussed in this paper, different types of normalization can be considered. Probably the most frequently applied transformation is simple normalization of individual signals that enables correction of differences between injected sample volumes. This type of preprocessing was applied to both sets of sage fingerprints. In addition to simple normalization, other types of normalization exist, e.g. scaling each signal to the largest peak observed in a signal or among all signals, the so-called Pareto scaling, vast scaling, etc. [37, 38].

To emphasize variability related to the variation among the sage fingerprints, they were also centred before comparative analysis. In that way, constant terms are removed from the data and data variability is set about its mean.

A comprehensive overview of different data preprocessing approaches can be found elsewhere [37], and a detailed discussion is also given in Ref. [39], and in the references contained therein.

Exploratory Analysis of the Sage (*Salvia* L.) Fingerprints Investigated

After preprocessing of the fingerprints (removal of uninformative regions from the chromatograms, elimination of the background and noise components, alignment of the fingerprints, and normalization), it is possible to explore differences among the samples. When data preprocessing is performed carefully, the undesired part of the data variation is removed. Comparative analysis of the samples can now be focused solely on the informative part of the data related to chemical variability among the samples.

Many chemometric techniques are suitable for exploration of differences among samples. In our study, principal component analysis (PCA) was used to study differences among the chromatographic fingerprints of the sage species.

The HS-GC-MS fingerprints represent the chemical contents of the volatile fraction of *Salvia* species. The first two principal components describe ca 46.6% of the total data variance. Data compression is not very efficient, and the score plot presented in Fig. 5 reveals an inhomogeneous data structure. It is possible to distinguish three groups of the samples. The first group contains nine samples (1, 3, 4, 9, 10, 12, 14, 15, and 18), the second

group contains eight samples (2, 5, 6–8, 16, 17, and 19), and the third group contains samples 11, 13, and 20. The numbers of the sage species discussed in this study are listed in *Table I*.

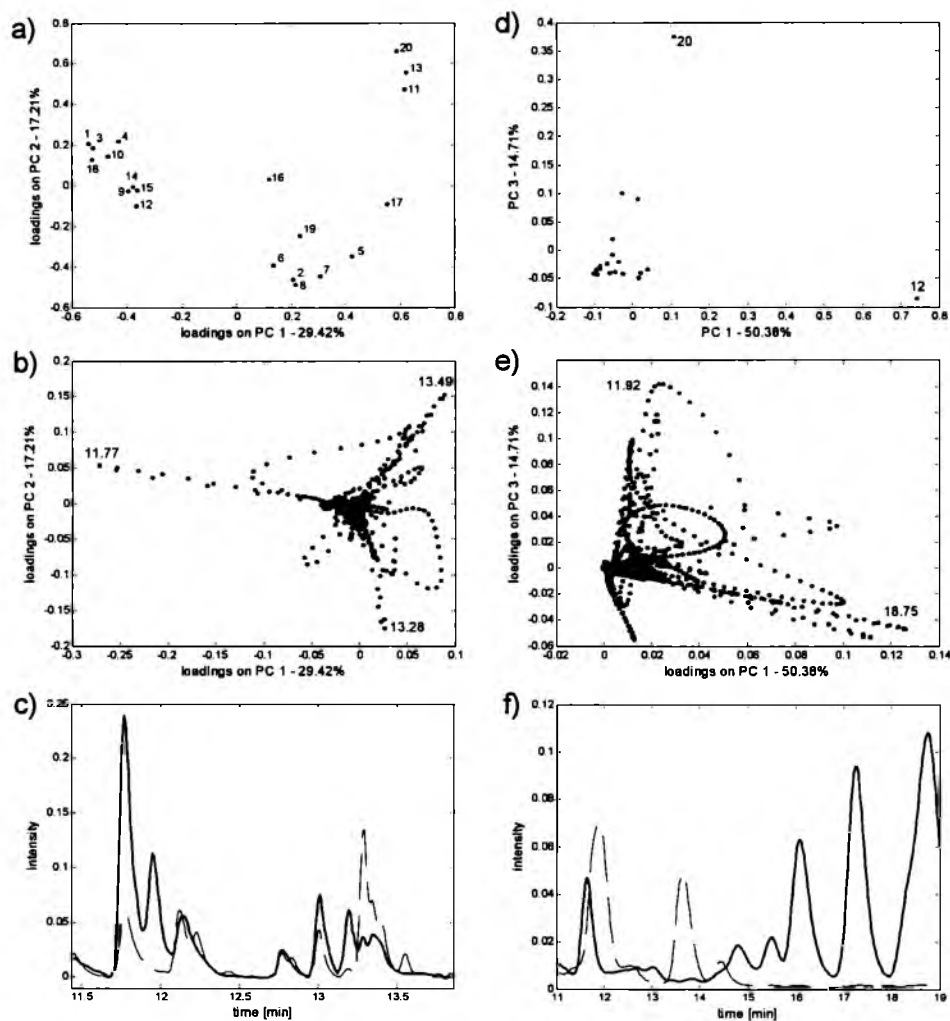


Fig. 5. (a) The PC1-PC2 score plot for the HS-GC-MS fingerprints. (b) Projection of the loadings on the space of the first two principal components. (c) Superimposed HS-GC-MS chromatograms from sage species 7 (dashed line, *S. cadmica*) and 14 (solid line, *S. nemorosa*), for which chemical differences were identified by use of PCA. (d) PC1-PC3 score plot for the HPLC fingerprints. (e) Projection of the corresponding loadings on the space of the first and third principal components. (f) Superimposed HPLC chromatograms from sage species 13 (solid line, *S. glutinosa*) and 20 (solid line, *S. officinalis*), for which chemical differences were identified by use of PCA

To interpret differences among the groups of sage samples, score and loading plots are interpreted simultaneously. The largest contribution to the first PC (PC1) is the peak of retention time, t_R 11.77 min; the largest to the second PC (PC2) are the peaks of t_R 13.28 and 13.49 min. We have previously shown that these peaks are those of camphene, limonene, and eucalyptol, respectively [40]. Samples from the first group have a relatively large peak at 11.77 min compared with samples from the other groups and, hence, these particular samples are relatively rich in camphene. Samples from the second group are characterized by medium amounts of camphene and very low amounts of limonene and eucalyptol. The unique properties of the samples from the third group can be explained by the loading values on PC2. For these particular samples, peaks with t_R 13.49 min (high intensity) and 11.77 and 13.28 min (both of low intensity) seem significant. These samples contain relatively small amounts of camphene and limonene, but larger amounts of eucalyptol. Fig. 5c shows a selected time region for two superimposed chromatograms, those from samples 7 (dashed line, *S. cadmica*) and 14 (solid line, *S. nemorosa*), for which chemical differences were identified by use of PCA. Chemical differences between the two groups of fingerprints are mostly quantitative in nature.

For the HPLC fingerprints, compression by means of PCA was quite effective, with the first two PCs explaining over 72% of the total data variance. The most interesting pattern of samples is revealed on the PC1–PC3 score plot (Fig. 5d). Two samples have unique properties, and are located far away from the main bulk of the data. These are the extracts of *S. glutinosa* (sample 13, with the large score value on PC1) and *S. officinalis* (sample 20, with a large score value on PC2). The uniqueness of *S. glutinosa* can mostly be explained by the presence of a relatively high peak at t_R 18.75 min whereas for *S. officinalis* a relatively large peak elutes at t_R 11.92 min (Fig. 5e). Selected regions of these two chromatograms are presented in Fig. 5f; the differences between them are very distinctly evident.

Conclusions

Preprocessing of chromatographic fingerprints is a crucial step which can be regarded as compulsory before commencing comparative analysis by use of chemometric techniques. Depending on the type of chromatographic signal and the problem scrutinized, different preprocessing of the chromatograms can prove necessary. When more than one type of preprocessing is required, however, it is necessary to choose the sequence of different preprocessing methods carefully. In this paper, we used a four-step preprocess-

ing strategy that can be followed when dealing with chromatographic fingerprints of plant extracts.

Many different chemometric techniques are suitable for exploratory analysis of chromatographic data. Among these, principal component analysis (PCA) has attracted most attention, because it enables study of differences among samples and acquisition of information on contributions of the original variables. For chromatographic signals, one can pinpoint relevant fingerprint regions that contain information valid for explanation of data structure observed on the score plot. Thus, it is potentially possible to collect a specific sample fraction and perform additional analyses that can support identification of the compounds of interest present in that fraction.

By applying PCA to fingerprints of the volatile fraction of different *Salvia* L. species it was possible to discover important regions explaining the differences among the samples scrutinized. The differences among the samples are mostly because of the presence of camphene, limonene, and eucalyptol.

References

- [1] S.J. Wagstaff, A Phylogenetic Interpretation of Pollen Morphology in Tribe MerAheae (Labiatae). In: R.M. Hariey and T. Reynolds (Eds) *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 1992, pp 113–124
- [2] M. Ahmed, I.P. Ting, and R.W. Scora, *J. Essent. Oil Res.*, **6**, 223–228 (1994)
- [3] L.E.W. Codd, *Lamiaceae*. In: *Flora of Southern Africa* **28**, 4. Botanical Research Institute, Pretoria, 1985
- [4] Z. Mirek, H. Piękoś-Mirkowa, A. Zając, and M. Zając, *Vascular Plants of Poland – A Checklist*. Władysław Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Science, Kraków, 1995
- [5] Y. Okuno and M. Miyazawa, *Lett. Drug Des. Discov.*, **1**, 66–68 (2004)
- [6] Y.-Z. Liang, P. Xie, and K. Chan, *J. Chromatogr. B*, **812**, 53–70 (2004)
- [7] J.H. Christensen, G. Tomasi, and A.B. Hansen, *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 255–260 (2005)
- [8] K.M. Aberg, R.J.O. Torgrip, and S.P. Jacobsson, *J. Chemometrics*, **18**, 456–473 (2004)
- [9] G. Malmquist, *J. Chromatogr. A*, **687**, 89–100 (1994)
- [10] A.M. van Nederkassel, C.J. Xu, P. Lancelin, M. Sarraf, D.A. MacKenzie, N.J. Walton, F. Bensaid, M. Lees, G.J. Martin, J.R. Desmurs, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, and Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1120**, 291–298 (2006)
- [11] M. Daszykowski and B. Walczak, *Trends Anal. Chem.*, **25**, 1081–1096 (2006)
- [12] D.L. Massart and L. Kaufman, *The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis*, R.E. Krieger, Florida, 1989
- [13] F.C. Sánchez, B. van den Bogaert, S.C. Rutan, and D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **34**, 139–171 (1996)
- [14] A. de Juan and R. Tauler, *Anal. Chim. Acta*, **500**, 195–210 (2003)
- [15] M. Daszykowski, B. Walczak, and D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **65**, 97–112 (2003)

- [16] P.H.C. Eilers, *Anal. Chem.*, **76**, 404–411 (2004)
- [17] D.F. Thekkudan and S.C. Rutan, Denoising and Signal-to-Noise Ratio Enhancement: Classical Filtering. In: S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak (Eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, pp. 9–24
- [18] J. Trygg, J. Gabrielsson, and T. Lundstedt, Background Estimation, Denoising, and Preprocessing. In: S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak (Eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, pp. 1–8
- [19] B. Walczak and D.L. Massart, *Trends Anal. Chem.*, **16**, 451–463 (1997)
- [20] B. Walczak and D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **36**, 81–94 (1997)
- [21] B. Walczak, *Wavelets in Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2000
- [22] S. Mallat, *IEEE T. Pattern Anal.*, **11**, 674–693 (1989)
- [23] F.-T. Chau, Y.-Z. Liang, J. Gao, X.-G. Shao, *Chemometrics from basics to wavelets*, Wiley, Hoboken, 2004
- [24] G. Malmquist and R. Danielsson, *J. Chromatogr. A*, **687**, 71–88 (1994)
- [25] N.-P.V. Nielsen, J.M. Carstensen, and J. Smedsgaard, *J. Chromatogr. A*, **805**, 17–35 (1998)
- [26] B. Walczak and W. Wu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **77**, 173–180 (2005)
- [27] A.M. van Nederkassel, M. Daszykowski, P.H.C. Eilers, and Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1118**, 199–210 (2006)
- [28] J. Forshed, I. Schuppe-Koistinen, and S.P. Jacobsson, *Anal. Chim. Acta*, **487**, 189–199 (2003)
- [29] J.H. Jellema, Variable Shift and Alignment. In S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak (Eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, pp. 86–108
- [30] V. Pravdova, B. Walczak, and D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, **456**, 77–92 (2002)
- [31] S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2**, 37–52 (1987)
- [32] G. Grygierczyk, M. Sajewicz, D. Staszek, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **32**, 1223–1240 (2009)
- [33] J. Rzepa, Ł. Wojtal, D. Staszek, G. Grygierczyk, K. Labe, M. Hajnos, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 575–580 (2009)
- [34] <http://www-stat.stanford.edu/software/wavelab/index.html>
- [35] http://www.models.kvl.dk/source/DTW_COW/index.asp
- [36] M. Daszykowski and B. Walczak, *J. Chromatogr. A*, **1176**, 1–11 (2007)
- [37] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, and M.J. vander Werf, *BCM Genomics*, **7**, 142 (2006)
- [38] M.M.W.B. Hendriks, L. Cruz-Juarez, D. De Bont, and R.D. Hall, *Anal. Chim. Acta*, **545**, 53–64 (2005)
- [39] S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak, *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, Data Preprocessing

Accepted by TK

Validated Binary High-Performance Thin-Layer Chromatographic Fingerprints of Polyphenolics for Distinguishing Different *Salvia* Species

Łukasz Ciesla¹, Michał Hajnos², Dorota Staszek³, Łukasz Wojtal³, Teresa Kowalska^{3,*}, and Monika Waksmundzka-Hajnos^{1,*}

¹Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland; ²Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, 1 Chodzki Street, 20-093 Lublin, Poland; and ³Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

Abstract

Salvia (sage) is the largest plant genus in the family Lamiaceae, embracing ca. 900 species. There is a growing interest in investigating chemical contents of different *Salvia* species, as some of them have been reported to exhibit a wide spectrum of biological activity. In this paper, conjugated (i.e., binary) chromatographic fingerprints have been introduced for the twenty *Salvia* species that are grown and cultivated in Poland. Apart from videoscans traditionally used for a comparison of the high-performance thin-layer chromatography fingerprints, digital scanning profiles and images obtained with use of the image processing program have also been employed. It is the first time that binary chromatographic fingerprints are used for the investigation of chemical contents of the *Salvia* species. The proposed procedure is rapid when compared with the similar ones presented in the literature, and moreover, it is easy to handle. The proposed method offers a possibility to discern the investigated species. It can be applied not only for chemotaxonomic purposes but also for finding new plant species that can be used as medical herbs (as it has been proposed, with *S. triloba* having a similar profile to *S. officinalis*). Validation of the method reveals that it is specific, reproducible, precise, and robust.

Introduction

Salvia (sage) genus embraces ca. 900 species, is widespread throughout the world, and includes several ornamental, culinary, and medical species (1). Different species from this genus are commonly used in traditional medicine due to a wide spectrum of biological activity (e.g., antioxidant, antiplatelet, anti-tumor, antiviral, etc.). Over the years, classification of different *Salvia* species has been very confusing. Many of them are similar to each other, and lots of them produce the varieties that have been given different specific names (2).

In recent years, much attention has been paid to biologically

active, water-soluble components, mainly polyphenolic flavonoids, phenolic acids, and simple coumarins, as *Salvia* preparations are used predominantly as water decoctions. The majority of phenolic acids in the *Salvia* species are the caffeic acid derivatives, whose depsides (e.g., rosmarinic and chlorogenic acid) are believed to be the major biologically active constituents (1). According to the literature, rosmarinic acid is the major phenolic compound responsible for antioxidant activity of *Salvia* samples (3). When it comes to flavonoids, flavones (apigenin, luteolin derivatives), flavonols (kaempferol and quercetin methyl esters), and their glycosides are the most widespread among the *Salvia* species (1). Investigation of chemical composition of the *Salvia* extracts can probably help to better understand the biological potential and the taxonomic relationships among the investigated species.

Chromatographic fingerprint profiling is a very convenient and effective method for quality assessment of herbal materials (4). By definition, chromatographic fingerprint is a chromatogram that represents chemical characteristics of herbal medicine (5). Several chromatographic techniques have been employed to construct fingerprints, such as high-performance liquid chromatography (HPLC) (6–9), high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) (4,10–13), gas chromatography (GC) (14), capillary electrophoresis (CE) (15,16), high-speed counter-current chromatography (HSCCC) (15,17), etc. Even, if HPLC is the fingerprinting method of the first choice due to its specificity, good separation power, and an ability to derive a plethora of chemical information (11), HPTLC offers a number of unique features that can outperform the other separation techniques used for the fingerprinting (18). Identification is one of the leading targets of HPTLC, and it is the only chromatographic method that allows presentation of the results in the picture form. The great advantage of HPTLC is the speed of method development also and its flexibility (12).

As plant extracts usually are very complex, it is hardly possible to find one chromatographic system enabling a satisfactory resolution of the sample's constituents. In a vast majority of published methods, chromatographic fingerprints are based on a single chromatogram. However, with complex natural samples

* Author to whom correspondence should be addressed: email monika.hajnos@am.lublin.pl and teresa.kowalska@us.edu.pl.

such an approach can prove inadequate (5). Several approaches have been proposed to fingerprint construction with very complex natural samples. Certain authors recommend a combination of analytical methods with different separation principles as with the development of *Caulophyllum robustum* fingerprint (19). Other authors advertise the construction of "multiple chromatographic fingerprints" as a beneficial solution (5). Hyphenated chromatographic techniques (HPLC–mass spectrometry, LC×LC, HPLC–nuclear magnetic resonance) also produce the information-rich fingerprints that are applicable to herb analysis (20,21). In paper (22), application of special modes of the chromatogram development has been proposed for complex samples. All the proposed techniques can provide the reliable results, yet in their case method development is not a trivial task. The application of hyphenated techniques and the combination of analytical methods demands usage of sophisticated equipment, whereas construction of multiple fingerprints and the use of special development modes can effectively be performed by means of HPTLC.

Several examples of *Salvia* fingerprints are present in the literature (15,17,20,23,24). Most of them focus on development of chromatographic profiles of *Salvia miltiorrhiza*, a traditional Chinese medicinal herb used for treating coronary heart disease, hepatitis, or insomnia. However, no chromatographic method has yet been established for a comparative analysis of the different *Salvia* species, especially those characteristic of Europe. Besides, all the existing methods focus on defining the acceptance criteria for one species only. Thus, for the chemotaxonomic research and also for the comparative studies, development of a new method is an urgent task.

Validation of qualitative methods is usually based on specificity, which has been commonly accepted as an only relevant aspect of an identification method. Recently, the trend started growing in favor of the adoption of the concepts of precision (repeatability, intermediate precision, and reproducibility), stability, and robustness as the separate validation points for the identification methods (25).

In this study, we present the development of the binary HPTLC chromatographic fingerprints with polar and semi-polar constituents for a variety of *Salvia* species. The main focus is on the presence of polyphenolics as major constituents, justifying common use of the different sage preparations. The method was validated according to the latest directives referring to the qualitative HPTLC methods (25). It is for the first time that the conjugated and comprehensively validated HPTLC fingerprint is used for authentication of species. Modeling of activity (e.g., extraction of information or the chemometric aspects of the fingerprint data analysis) remains outside the scope of this paper.

Experimental

Apparatus and reagents

The following standards, caffeic acid, chlorogenic acid, *trans*-*p*-coumaric acid, ferulic acid, protocatechuic acid, and rosmarinic acid were obtained from ChromaDex (Santa Ana, CA),

and the remaining standards were purchased from Aldrich (St. Louis, MO).

n-Hexane, methanol (96%), toluene, ethyl acetate, and formic acid used as the extracting solvents or the mobile phase components were manufactured by Merck (Darmstadt, Germany). Acetic acid and sulfuric acid were obtained from Polish Reagents (Gliwice, Poland). All these solvents were of analytical purity grade. AlCl_3 was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland).

TLC was performed on glass-backed silica gel HPTLC 60F254s plates purchased from Merck (10 cm × 20 cm and 10 cm × 10 cm).

Solutions of all test substances and plant extracts were applied to the chromatographic plates band-wise by means of a Camag automatic TLC sampler (Muttentz, Switzerland) and developed in the horizontal DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland). Location of the bands was carried out in visible and UV ($\lambda = 254$ and 366 nm) light after derivatization. Chromatograms were documented with use of the Camag TLC Reprostar 3 device with Videostore computer program and scanned with the Camag TLC scanner 3 densitometer equipped with the CATS 4 computer program. Additionally, videoscans and densitograms were processed with use of Image J image processing program, which is available on-line and elaborated by the National Institutes of Health.

Table I. The Used Polyphenolic Standards

Substance	Symbol	RF of solvent system 1	Color after spraying with H_2SO_4 ($\lambda = 366$ nm)
Rutin	R	0.0	Brown
Kaempferol	K	0.09	Purple
Luteolin	L	0.09	Purple
<i>o</i> -Coumaric acid	<i>o</i> -C	0.22	Pale orange
Caffeic acid	Cf	0.11	Dark blue
Gallic acid	Ga	0.06	Dark purple
Rosmarinic acid	Rm	0.04	Dark purple
Protocatechuic acid	Pc	0.11	Purple
Ferulic acid	F	0.22	Brown
Chlorogenic acid	Ch	0.0	Purple
Aesculetin	Ae	0.10	Blue
Scopoletin	Sc	0.20	Blue
Vanillic acid	V	ND*	–
Sinapinic acid	S	0.40	Purple
<i>trans</i> - <i>p</i> -Coumaric acid	<i>tp</i> -C	0.42	Orange
Gentisic acid	G	0.45	Brown
7-Hydroxycoumarin	hCo	0.47	Blue
Cinnamic acid	Ci	ND*	–
3,5-Dihydroxybenzoic acid	B	0.25	Dark green
Coumarin	Co	ND*	–
Acacetin	A	ND*	–
Naringenin	N	0.44	Purple
Hiperosid	H	0.0	Brown
<i>p</i> -Coumaric acid	<i>p</i> -C	0.49	Pink/brown†
<i>m</i> -Coumaric acid	<i>m</i> -C	0.41	Dark green
Quercetin	Q	0.0	Brown
Hemiarin	He	0.55	Blue
Hesperitin	Hs	0.46	Purple
Apigenin	Ap	ND*	–

* Not detected at $\lambda = 366$ nm.

† After some time.

Standard substance solutions and plant extracts

All reference substances were dissolved in methanol to prepare the 1.0 mg/mL solutions. The list of the used standards is given in Table I.

Extracts from the twenty dried *Salvia* species, namely: *S. lavandulifolia*, 1; *S. sclarea*, 2; *S. tesquicola*, 3; *S. staminea*, 4; *S. amplexicaulis*, 5; *S. cadmica*, 6; *S. pratensis*, 7; *S. canariensis*, 8; *S. nemorosa*, 9; *S. jurisicii*, 10; *S. stepposa*, 11; *S. hians*, 12; *S. officinalis*, 13; *S. forskahlei*, 14; *S. azurea*, 15; *S. verticillata*, 16; *S. triloba*, 17; *S. deserta*, 18; *S. glutinosa*, 19; *S. atropatana* 20 (Table II); were obtained from the plants collected in the Pharmacognosy Garden (Lublin, Poland) in the course of the vegetation periods of 2007 and 2008. Botanical material was authenticated and voucher specimens were deposited at the Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, Poland. This material was oven-dried at a temperature not exceeding 40°C for 40 h and remained frozen until the day of analysis.

All samples were milled into a powder and oven-dried at 35°C until a constant weight was obtained. Accelerated solvent extraction (ASE) was performed with the ASE extractor (Dionex, Sunnyvale, CA). Firstly, 5 g of each sample was extracted with *n*-hexane and then with methanol. *n*-Hexane extracts were discarded, as they contained mainly chlorophylls and apolar, water-insoluble constituents. The optimized extraction conditions were: temperature, 40°C (*n*-hexane) and 100°C (methanol); pressure, 68 atm (*n*-hexane) and 65 atm (methanol); initial heating time, 10 min (*n*-hexane) and 2 min (methanol); heating time after introduction of solvent, 5 min (both solvents); static extraction time, 5 min (both solvents); solvent volume, 40 mL (both solvents); the number of cycles, 2 (both solvents). The obtained methanol extracts were evaporated to dryness in a rotary evaporator under reduced pressure, and the residue was dissolved in 5 mL of methanol. All sample solutions were then placed in an ultrasonic bath (model RK 255H Sonorex

Super; Bandelin, Berlin, Germany) for 15 min. Finally, the samples were concentrated to a volume of 1 mL each, and filtered through a membrane filter Anotop (0.02 µm, cat. # 11320; Merck). Samples prepared in such a way underwent the chromatographic analysis.

Chromatography

Standard and sample solutions were applied to the 10 cm × 20 cm silica HPTLC plates band-wise (band length 12 mm, 1 µL/s delivery speed, track distance 1 mm, distance from the left edge 10 mm and from the low edge 10 mm). With the 10 cm × 10 cm plates, the following application parameters were set: band length 5 mm, 1 µL/s delivery speed, track distance 6 mm, distance from the left edge 5 mm and from the low edge 10 mm. The 5-µL aliquots of standard solutions and 10-µL aliquots of the investigated *Salvia* samples were applied onto the plates. The plates were dried in a hood for 10 min before development. The plates were developed in the horizontal DS chambers without chamber pre-saturation step at ambient temperature 20 ± 1°C. The following mobile phases were used for the less polar constituents: solvent system 1, 1a, 1b, 1c; for polar and highly polar substances, the following eluents were applied: 2, 2a, 2b, and 2c (mobile phases' composition can be found in Table III). The plates were developed to the distance of 90 mm. The plates were dried at room temperature for 15 min prior to derivatization.

Derivatization and documentation

Sulfuric acid reagent was prepared by mixing 10 mL concentration sulfuric acid with 90 mL methanol. Both reagents were cooled in a refrigerator for 30 min prior to mixing. The AlCl₃ derivatizing agent was prepared by dissolving 1 g aluminum chloride in 99 g methanol.

For detection of semi-polar constituents, the plates developed with mobile phase 1 were sprayed with 10% concentration H₂SO₄ in methanol and heated at 105°C for 10 min. The plates developed with eluent 2 were sprayed with the AlCl₃ reagent and documented. The plates were sprayed with use of the automatic spraying device (Merck).

Plate images were taken in visible and UV (λ = 254 and 366 nm) light, and scanned at λ = 254 and 366 nm with the slit parameters 1 mm × 0.1 mm. Bands in the analyzed samples were identified by matching their RF values and UV-Vis spectra with those obtained for the standards. Peak purity was checked by recording the UV-vis spectra at the centre and the peak flanks.

Table II. Extracts from the 20 Dried *Salvia* Species

Name	Identification Number used in Figures
<i>S. lavandulifolia</i>	1
<i>S. sclarea</i>	2
<i>S. tesquicola</i>	3
<i>S. staminea</i>	4
<i>S. amplexicaulis</i>	5
<i>S. cadmica</i>	6
<i>S. pratensis</i>	7
<i>S. canariensis</i>	8
<i>S. nemorosa</i>	9
<i>S. jurisicii</i>	10
<i>S. stepposa</i>	11
<i>S. hians</i>	12
<i>S. officinalis</i>	13
<i>S. forskahlei</i>	14
<i>S. azurea</i>	15
<i>S. verticillata</i>	16
<i>S. triloba</i>	17
<i>S. deserta</i>	18
<i>S. glutinosa</i>	19
<i>S. atropatana</i>	20

Table III. Mobile Phases Used in the Experiment

Symbol	Mobile phase (quantitative composition, v/v)
1	Toluene–ethyl acetate–formic acid (70:30:1)
1a	Toluene–ethyl acetate–formic acid (68:32:1)
1b	Toluene–ethyl acetate–formic acid (72:28:1)
1c	Toluene–ethyl acetate–formic acid (70:30:0.8)
2	Ethyl acetate–water–formic acid–acetic acid (100:26:11:11)
2a	Ethyl acetate–water–formic acid–acetic acid (98:28:11:11)
2b	Ethyl acetate–water–formic acid–acetic acid (102:24:11:11)
2c	Ethyl acetate–water–formic acid–acetic acid (100:26:10:12)

Method validation

Method was validated for its specificity, precision (repeatability and intermediate precision), stability, and robustness, according to the recognized AOAC guidelines (25). Precision was expressed as precision of the positions (the RF values) of the separated zones. Checking repeatability, three individual portions of a given *Salvia* sample were prepared according to the earlier described method. Three aliquots of each sample were applied onto the three plates. The plates were subsequently chromatographed using the same chamber but with a fresh portion of mobile phase each time. The intermediate precision test was performed in an analogous way, i.e., a number of the selected *Salvia* species were chromatographed on the three different days, one sample per one species. Variability of RF values for several “marker zones” across each plate and variability of the average RF values of those markers on the three plates was evaluated.

Stability on the plate was determined by comparing fingerprints obtained for the samples applied to the plates by 1, 2, and 3 h prior to the development with the fingerprint obtained for the sample applied just before the development.

Stability of the sample in solution was determined by multiple measurements of one and the same sample solution at different storage times, i.e., after 0, 6, 24, and 48 h. In order to check sample stability during the chromatographic process, a simple 2D test was performed, i.e., selected *Salvia* samples were chromatographed with the same eluent in both directions. To this effect, solvent systems 1 and 2 were checked.

The influence of the mobile phase composition, heating temperature, and drying time on the final results was also checked: In this part of the experiment, mobile phases 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, and 2c were tested. The plates were sprayed with 10% concentration H_2SO_4 solution in methanol and then heated at 95, 100, 102, 105, 107, and 110°C. To check the influence of the drying time, the plates were derivatized with use of sulfuric acid reagent 15, 20, 30, and 45 min after the removal from a chromatographic chamber.

Results and Discussion

It is essential for the fingerprint analysis to work with an authenticated botanical reference material. To this effect, all *Salvia* species analyzed in our experiment were grown in the same conditions and harvested on the same day, and they have undergone an identical drying procedure.

Application of solvent system 1 enabled separation of less and semi-polar compounds. However, certain higher polar substances remained at the start, e.g., rutin, chlorogenic acid, or quercetin (Table I), as it can be seen from Figures 1–2 (See Page 3A). For the separation of these compounds, solvent system 2 was used. Then the less polar constituents were squeezed near the front line of the chromatogram with an inadequate separation (Figure 2, See Page 3A). Use of the two chromatographic systems generates comprehensive information on a botanical

drug. The band of rosmarinic acid appeared as a “boundary” between the less and the more polar fraction on the HPTLC images (Figure 3, See Page 4A), and these images were linked to give conjugated fingerprints of the *Salvia* species. The applied chromatographic systems caused separation of several polyphenolic compounds present in different *Salvia* samples. However, some overlapping bands can be seen (Figure 1–2, See Page 3A). For fingerprint construction, complete resolution of all the substances present in the extract is not needed. For accurate quantitative data, further adjustments of the presented systems should be performed. Multiple fingerprints have been generated from the same plate by multiple detections, different derivatizing agents, detection under visible or UV light, etc., as presented in Figure 3, See Page 4A.

Applying commonly used AlCl_3 solution caused this reagent, several blue spots were visualized on the plate developed with solvent system 1. However, with several species (e.g., *S. hians*, *S. verticillata*, *S. pratensis*, *S. azurea*, etc.), either no spots at all or very pale ones appeared. The use of sulfuric acid as a visualizing reagent produced chromatograms with a greater amount of chromatographic bands, thus generating more informative fingerprints (Figure 1, See Page 3A). The AlCl_3 solution turned out a better choice for the fingerprints generated with use of solvent system 2, which was aimed at the more polar compounds. Several spots visible in UV light ($\lambda = 366 \text{ nm}$) appeared on the chromatograms due to the presence of polar flavonoid glycosides, aglycones, and more polar phenolic acids (Figure 2, See Page 3A).

All the investigated samples were checked for the presence of 29 polyphenolics by comparing the RF values, colors, and UV-Vis spectra for the bands of the standards with those originating from the samples. However, for the fingerprint comparison, bands with an unknown identity were also taken into the account. For fingerprint construction, the identity of all the components does not have to be known. The comparison of the samples is performed on the basis of the obtained HPTLC images.

Several zones have been identified in all analyzed *Salvia* species, which can be regarded as the markers. The presence of two phenolic acids, very important from the medicinal point of view (i.e., caffeic and rosmarinic acid) was confirmed in all the samples. In chromatographic system 1, rosmarinic acid shows $\text{RF} = 0.04$ (blue zone before derivatization and dark purple one after derivatization with the sulfuric acid reagent). Its presence is even better confirmed upon application of solvent system 2. Rosmarinic acid appears as a blue band ($\text{RF} = 0.77$) visualized by the AlCl_3 reagent. In chromatographic system 1, caffeic acid can be identified as a blue band ($\text{RF} = 0.11$). There are also other common zones, obtained with use of eluent system 1, that is characteristic of all the investigated *Salvia* species. One is a pink band of *p*-coumaric acid (UV, $\lambda = 366 \text{ nm}$), which appears soon after derivatization with $\text{RF} = 0.49$. It can also be detected in visible light as an intense purple zone that turns brown some time after derivatization with the sulfuric acid reagent. Two *Salvia* species, *S. sclarea* and *S. canariensis*, are characterized by relatively low amounts of this substance when compared with the other investigated plant species. Another characteristic pink zone (turning orange after certain period of time; UV, $\lambda = 366$

nm) can be identified in all fingerprints obtained with chromatographic system 1 ($RF = 0.26$), although it is less distinct with *S. canariensis*. There is also one orange band at $RF = 0.58$ noticeable in all the investigated samples. In the case of fingerprints obtained after application of solvent system 2, the following bands can be considered markers for all the investigated species: blue spot of rosmarinic acid, $RF = 0.77$ ($AlCl_3$ reagent, UV light, $\lambda = 366$ nm), and a band at $RF = 0.61$, corresponding to rutin. Chlorogenic acid was identified in several *Salvia* species, such as in *S. pratensis*, *S. amplexicaulis*, and *S. nemorosa*. Rutin and chlorogenic acid were identified only upon using solvent system 2, and with chromatographic system 1 they always remained at the start line.

The digital scanning profiles and those obtained with application of the Image J processing program are used in parallel with the traditional ways of presenting fingerprints. Binary chromatographic fingerprints are used for a comparison of the constituent contents in the extracts obtained from the dried *Salvia* samples and to define similarities and differences in the chemical profiles of the investigated plant species. Digital scanning profiles allow detection of the constituents that are difficult to see in the videoscans and also to assess the amounts of compounds (Figure 4, See Page 3A). This option has proved very useful with the plates developed in solvent system 2 and derivatized with the $AlCl_3$ solution. Bands not clearly seen in the videoscans were well presented in the densitograms. The "image calculator" function of the Image J program was applied to compare the fingerprints, exposing differences that otherwise can easily pass unnoticed (Figure 5).

Salvia officinalis is the only pharmacopoeial species in this study present in the traditional Polish medicine. Fingerprint analysis can prove useful in targeting species that have similar chemical profiles and hence are good candidates for herbal remedies. A comparison of fingerprints obtained from solvent systems 1 and 2 shows that *S. triloba* has very similar chemical profiles to those of *S. officinalis* (Figure 5B). Both species characterize with

the presence of dark bands in the less polar fraction (under the orange band of *p*-coumaric acid with the RF values of 0.38 and 0.44, and one above *p*-coumaric acid with an $RF = 0.57$). The aforementioned dark bands can also be seen in the fingerprint of *S. canariensis*, although this species characterizes with a relatively low amount of *p*-coumaric acid. Despite very similar fingerprints, a closer look enables differentiation between *S. officinalis* and *S. triloba*. This can be done comparing the more polar fraction. Here an additional yellow zone is also present in the lower RF range in the case of *S. triloba*. Other species produce distinctive fingerprints of their own, so *S. officinalis* can easily be distinguished from them.

For a better description of chromatographic profiles, we propose to divide the whole chromatogram obtained with solvent system 1 into three parts, using two marker compounds ($RF = 0.26$ and $RF = 0.49$) as the border zones, as presented in Figure 5. The amount, position, color, and intensity of all bands present in each of the three parts were compared for all the investigated samples. Densitograms and images constructed with use of Image J program were also utilized for the comparative studies. A comparison of each part of each fingerprint revealed that all investigated *Salvia* species characterize with an identical or at least a very similar profile of the first part (zone between the application position and the marker band at $RF = 0.26$). This part of the fingerprint can be regarded as characteristic for all the investigated *Salvia* samples. The other two zones of the chromatogram are more specific for the individual species and can be used for differentiation thereof.

The following *Salvia* species produce comparable overall fingerprints, obtained with chromatographic system 1: *S. tesquicola*, *S. amplexicaulis*, *S. cadmica*, *S. nemorosa*, *S. jurisicii*, *S. stepposa*, *S. glutinosa*, and *S. atropatana*. Similarity can also be observed for the same species in the case of the fingerprints of more polar constituents. All the aforementioned species are characterized by the presence of zones (UV light, $\lambda = 366$ nm) with the lower RF values that are missing in the chromatographic profiles of the other investi-

gated plant samples (solvent system 2). This group of *Salvia* species can further be divided into the smaller subgroups, based on the obtained fingerprints. *S. tesquicola*, *S. amplexicaulis*, and *S. cadmica* can easily be differentiated from the rest, due to the presence of a blue band of herniarin ($RF = 0.55$) (marked in Figure 5A). However, with *S. cadmica*, a zone at $RF = 0.45$ is missing, which is clearly seen with the other two species. Remaining species, although producing similar fingerprints, can also be differentiated from one another. For the sake of an example, *S. jurisicii* is characterized by the presence of a pale orange zone ($RF = 0.32$) that is not observed in the other profiles.

Based on fingerprints, *S. officinalis*, *S. triloba*, and *S. canariensis* can be classified into a separate group of species, characterizing with similar chromatographic profiles. The color and sequence of zones character-

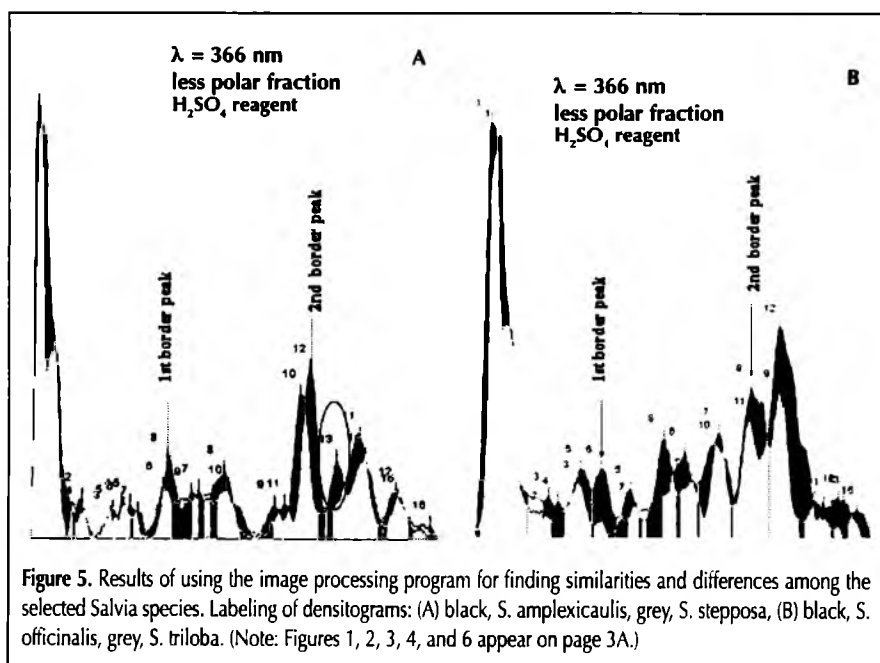


Figure 5. Results of using the image processing program for finding similarities and differences among the selected *Salvia* species. Labeling of densitograms: (A) black, *S. amplexicaulis*, grey, *S. stepposa*, (B) black, *S. officinalis*, grey, *S. triloba*. (Note: Figures 1, 2, 3, 4, and 6 appear on page 3A.)

istic for these species has already been described in this study. The following *Salvia* species can be assigned to the third group: *S. sclarea*, *S. staminea*, *S. pratensis*, *S. hians*, *S. forskaohlei*, *S. azurea*, *S. verticillata*, and *S. deserta*. All three parts of their respective fingerprints obtained with solvent system 1 contain lesser bands than those of the other species. The same can be said about the respective chromatographic profiles originating from solvent system 2. However, this subgroup is considerably more heterogeneous when compared with the other two.

Salvia lavandulifolia produces a fingerprint that is completely different from the other chromatographic profiles, and hence, it cannot be ascribed to any of the aforementioned groups.

A comparison of the contents of several phenolic acids shows that *S. officinalis* produces the highest yields of polyphenolics among all the analyzed species (Figure 6B, See Page 3A). Other species characterized with the relatively high total peak areas include *S. lavandulifolia*, *S. triloba*, *S. nemorosa*, *S. jurisicii*, *S. azurea*, and *S. atropatana*. *Salvia sclarea*, *S. deserta*, and *S. staminea* produce the lowest total peak area values. *Salvia lavandulifolia*, *S. tesquicola*, *S. canariensis*, *S. nemorosa*, *S. stepposa*, and *S. hians* contain the greatest amount of caffeic acid, whereas *S. lavandulifolia*, *S. jurisicii*, *S. azurea*, *S. nemorosa*, and *S. hians* are characterized by the highest *p*-coumaric acid contents (Figure 4, See Page 3A).

From Figures 1–2 (See Page 3A), the proposed method is specific for individual *Salvia* species. All the analyzed species produce distinctive fingerprints, thus they can easily be differentiated. Fingerprints obtained in the repeatability and intermediate precision tests have been identical in terms of the amount of peaks, appearing in the individual chromatograms. The variability of the RF values tested for several randomly chosen bands does not exceed 0.02 for repeatability and 0.04 for intermediate precision, meeting the cGMP regulations (25). The obtained results indicate that all the peaks present in HPTLC profiles can be assigned as “common peaks”, which represent the characteristics of the particular *Salvia* species. The further use of these chromatographic profiles for the comparison between different species is therefore justified (Figure 5).

Stability of the samples in the course of the chromatographic process was evaluated by means of a 2D experiment. All the spots were lying on the diagonal after checking solvent systems 1 and 2; thus the analyzed samples proved stable during the process. The samples proved stable in the solution also.

As the fingerprints were visualized with use of derivatization, stability of the results was also evaluated. Images taken 5 and 10 min after the completion of derivatization did not differ from those obtained immediately after derivatization. However, after 30 min, several bands have changed their color from pink to orange, and certain bands (e.g., caffeic acid) were even better detected, as can be seen from Figure 6 (See Page 3A). After 24 h, the fingerprints did not change, and all the separated zones were clearly visible without any further change in the band color. Thus one can expect reliable results when images are taken immediately after completion of derivatization and then they are compared after certain amount of time.

In the course of method development, the impact of several experimental parameters was tested, such as the mobile phase composition, heating temperature, and drying time. All the scruti-

tinized changes exert minor effect on fingerprints, except for the heating temperature. When the temperature was lower than 100°C, the obtained zones were fainter and some of them were not seen at all. Thus, it is important to maintain the temperature during the method development within the range of $105 \pm 2^\circ\text{C}$. As far as the changes in mobile phases' composition are considered, only minor shifts in RF values (± 0.02) were observed, which did not lead to any significant differences in the chromatographic profiles.

The method was validated in terms of specificity, precision (repeatability and intermediate precision), stability, and robustness. Detailed description of the performed tests is given in the experimental section.

When compared to HPLC fingerprinting methods, HPTLC fingerprint application is characterized definitely with worse resolution and reproducibility. However the obtained results show that TLC fingerprints are a good choice for the parallel comparison of several samples at a relatively short time and are more cost-effective. One of the greatest advantages of the proposed solution is probably the provision of colorful images.

Conclusion

A new chromatographic procedure has been proposed for developing fingerprints with twenty different *Salvia* species. Use of the digital scanning profiles and images obtained with the image processing program makes the comparative studies performed in the course of the fingerprint development easy. The proposed method turned out to be useful in defining chemical similarities and differences of the investigated species. It can be applied to chemotaxonomic research focused on defining relationships within the *Salvia* genus. Presented method is easy to operate and is speedy, as the results for 20 samples (including sample application, chromatogram development, derivatization, and documentation) can be obtained within ca. 1 h. The validation of the method clearly indicates that it is a reliable chromatographic procedure.

Acknowledgments

This work was financially supported by grant no N N405 365137 from Ministry of Science and Higher Education.

References

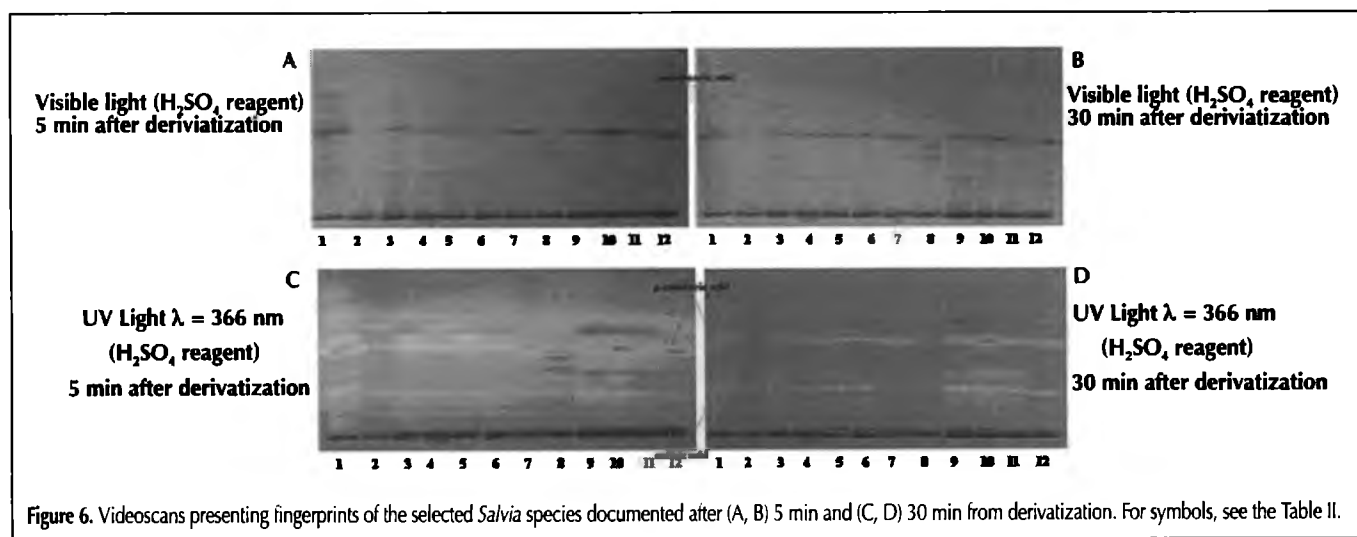
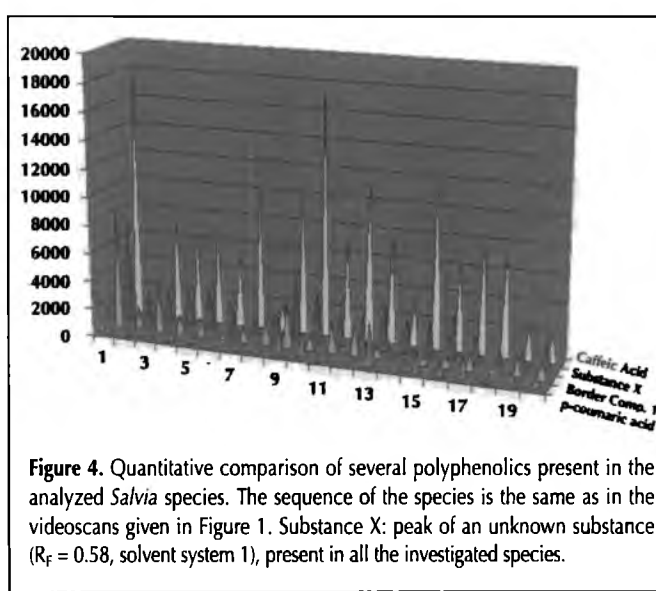
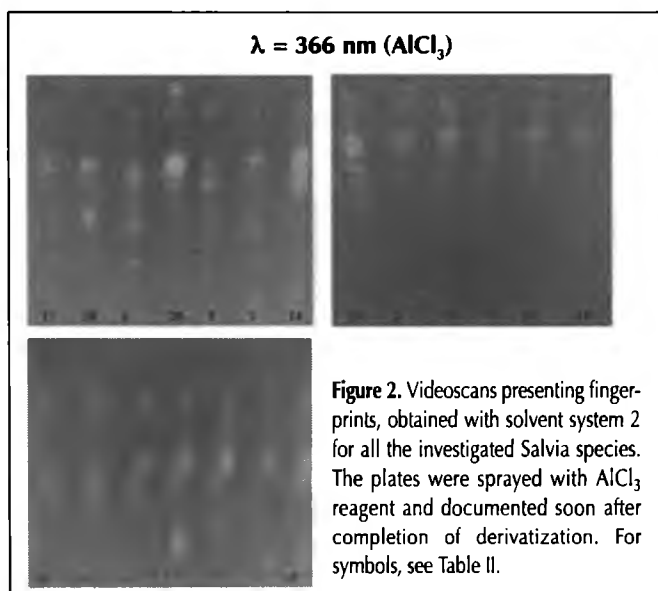
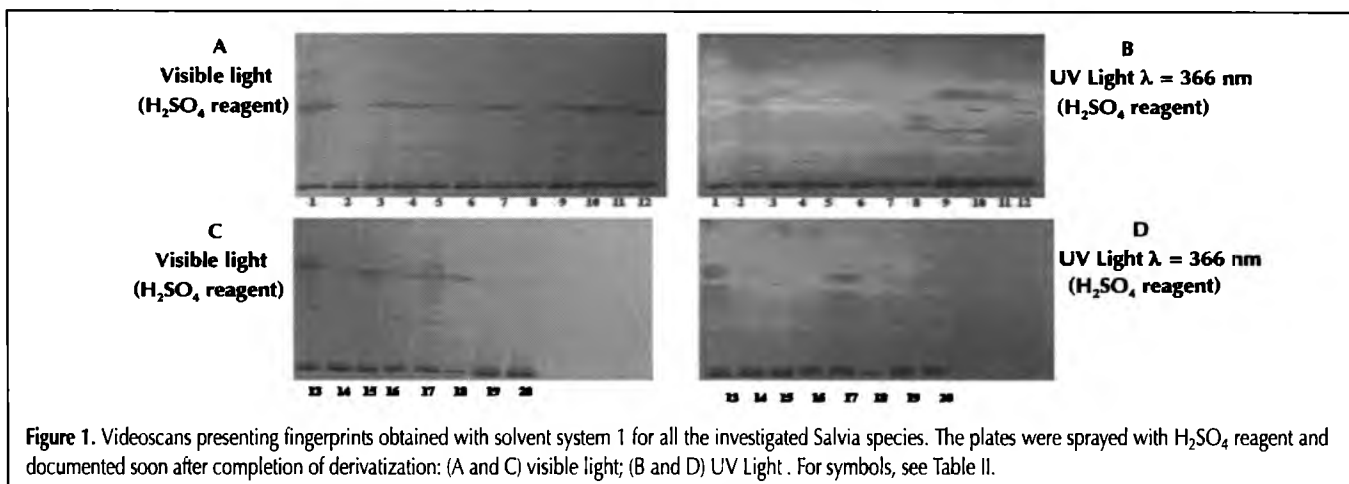
1. Y. Lu and Y. Foo. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochem.* **59**: 117–140 (2002).
2. J.B. Walker, K.J. Sytsma, J. Treutlein, and M. Wink. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *Am. J. Bot.* **91**: 1115–1125 (2004).
3. M.E. Cuvelier, H. Richard, and C. Berset. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 645–652 (1996).

4. S.B. Chen, H.P. Liu, R.T. Tian, D.J. Yang, S.L. Chen, H.X. Xu, A.S.C. Chan, and P.S. Xie. High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of isoflavonoids for distinguishing between *Radix Puerariae* Lobate and *Radix Puerariae* Thomsonii. *J. Chromatogr. A* **1121**: 114–119 (2006).
5. X.H. Fan, Y.Y. Cheng, Z.L. Ye, R.Ch. Lin, and Z.Z. Qian. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Anal. Chim. Acta* **555**: 217–224 (2006).
6. S. Xu, L. Yang, R. Tian, Z. Wang, Z. Liu, P.S. Xie, and Q. Feng. Species differentiation and quality assessment of *Radix Paeoniae Rubra* (Chi-shao) by means of high-performance liquid chromatographic fingerprint. *J. Chromatogr. A* **1216**: 2163–2168 (2009).
7. G.H. Lu, K. Chan, Y.Z. Liang, K. Leung, Ch.L. Chan, Z.H. Jiang, and Z.Z. Zhao. Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese *Angelica* from related umbelliferae herbs. *J. Chromatogr. A* **1073**: 383–392 (2005).
8. Ch. Chen, H. Zhang, W. Xiao, Z.P. Yang, and N. Bai. High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *J. Chromatogr. A* **1154**: 250–259 (2007).
9. G. Alaerts, N. Matthijs, J. Smeyers-Verbeke, and I. Vander Heyden. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. *J. Chromatogr. A* **1154**: 1–8 (2007).
10. S. Cui, B. Fu, F.S.C. Lee, and X. Wang. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). *J. Chromatogr. B* **828**: 33–40 (2005).
11. G.S. Qian, Q. Wang, K.S.Y. Leung, Y. Qin, and Z.Z. Zhao. and Z.H. Jiang. Quality assessment of *Rhizoma et Radix Notopterygii* by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**: 812–817 (2007).
12. E. Reich, A. Blatter, R. Jorns, M. Kreuter, and K. Thiekkötter. An AOAC peer-verified method for identification of *Echinacea* species by HPTLC. *J. Planar Chromatogr.* **15**: 244–251 (2002).
13. R.T. Tian, P.S. Xie, and H.P. Liu. Evaluation of traditional Chinese herbal medicine: *Chaihu* (*Bupleuri Radix*) by both high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic fingerprint and chemometric analysis. *J. Chromatogr. A* **1216**: 2150–2155 (2009).
14. L.T. Vaz-Freire, M.D.R.G. da Silva, and A.M.C. Freitas. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for fingerprint pattern recognition in olive oils produced by two different techniques in Portuguese olive varieties *Galega Vulgar*, *Cobrançosa* e *Carrasquenha*. *Anal. Chim. Acta* **633**: 263–270 (2009).
15. M. Gu, S. Zhang, Z. Su, Y. Chen, and F. Ouyang. Fingerprinting of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by non-aqueous capillary electrophoresis compared with high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1057**: 133–140 (2004).
16. Y. Sun, T. Guo, Y. Sui, and F. Li. Fingerprint analysis of *Flos Carthami* by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **792**: 147–152 (2003).
17. M. Gu, G. Zhang, Z. Su, and F. Ouyang. Identification of major active constituents in the fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* Bunge developed by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* **1041**: 239–243 (2004).
18. Ł. Ciesla and M. Waksmundzka-Hajnos. Comparing TLC methods for constructing medicinal plant fingerprints. *Sep. Sci.* **6**: 22–27 (2009).
19. Y. Li, Z. Hu, and L. He. An approach to develop binary chromatographic fingerprints of the total alkaloids from *Caulophyllum robustum* by high performance liquid chromatography/diode array detector and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**: 1667–1672 (2007).
20. A.H. Liu, Y.H. Lin, M. Yang, H. Guo, S.H. Guan, J.H. Sun, and D.A. Guo. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn. *J. Chromatogr. B* **846**: 32–41 (2007).
21. M. Kivilompolo and T. Hyötyläinen. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J. Chromatogr. A* **1145**: 155–164 (2007).
22. Ł. Ciesla, A. Bogucka-Kocka, M. Hajnos, A. Petruczynik, and M. Waksmundzka-Hajnos. Two-dimensional thin-layer chromatography with adsorbent gradient as a method of chromatographic fingerprinting of furanocoumarins for distinguishing selected varieties and forms of *Heracleum* spp. *J. Chromatogr. A* **1207**: 160–168 (2008).
23. L. Ma, X. Zhang, H. Zhang, and Y. Gan. Development of a fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *J. Chromatogr. B* **846**: 139–146 (2007).
24. X.F. Jin, Y.H. Lu, D.Z. Wei, and Z.T. Wang. Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R.Br. by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 100–104 (2008).
25. E. Reich, A. Schibli, and A. DeBatt. Validation of high-performance thin-layer chromatographic methods for the identification of botanicals in a cGMP environment. *J. AOAC Int.* **91**: 13–20 (2008).

Manuscript received November 10, 2009;
revision received January 18, 2010.

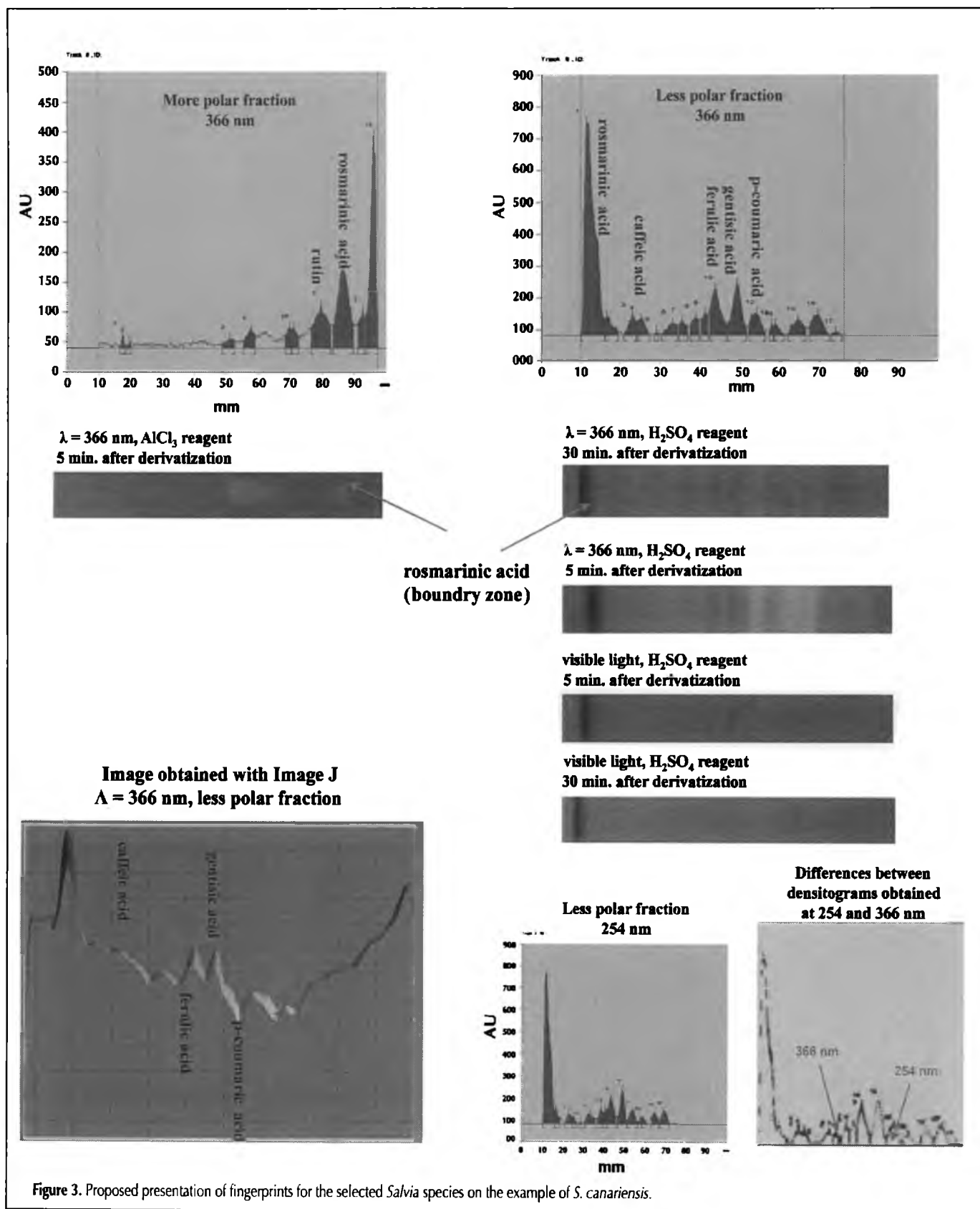
Validated Binary High-Performance TLC Fingerprints of Polyphenolics for Distinguishing Different *Salvia* Species

Figures shown in color from article found on page 421–427. Due to the large size of Figure 3, figures appear out of order



Validated Binary High-Performance TLC Fingerprints of Polyphenolics for Distinguishing Different *Salvia* Species

Figures shown in color from article found on page 421–427.

Figure 3. Proposed presentation of fingerprints for the selected *Salvia* species on the example of *S. canariensis*.

Binary HPLC-Diode Array Detector and HPLC-Evaporative Light-Scattering Detector Fingerprints of Methanol Extracts from the Selected Sage (*Salvia*) Species

MIECZYSLAW SAJEWICZ, DOROTA STASZEK, ŁUKASZ WOJTAL, and TERESA KOWALSKA¹

University of Silesia, Institute of Chemistry, 9 Szkolna St, Katowice, Poland

MICHAŁ Ł. HAJNOS

Medical University of Lublin, Department of Pharmacognosy, 1 Chodźki St, 20-093 Lublin, Poland

MONIKA WAKSMUNDZKA-HAJNOS

Medical University of Lublin, Department of Inorganic Chemistry, 6 Staszica St, 20-081 Lublin, Poland

This study is focused on an important family of the sage (*Salvia*) species, with *Salvia officinalis* L. having a long-established position in European traditional medicine. Binary fingerprints (chromatographic profiles) of six different sage species were compared using HPLC coupled with two different detectors: the diode-array detector and the evaporative light-scattering detector. Advantages of using binary fingerprinting over single-detector fingerprinting are demonstrated and discussed, with selected examples. Experimental data are provided for a comparison of the chemical composition of sage samples originating from two harvesting seasons (2007 and 2008). A number of phytochemical standards (i.e., certain phenolic acids, flavonoids, and coumarin) were used that allowed identification and semiquantitative estimation of these particular compounds in the analyzed methanol extracts.

Herbal medicines have been used for clinical treatment for thousands of years. Today, a plethora of medicinal plant species are recorded in herbal pharmacopeias throughout the world. Active components of herbal medicines are strongly influenced by soil and climate, and by the growth stage when harvested, which makes QC necessary prior to their curative application. Fingerprinting is a popular method used to control the quality of plant material, as it provides important chemical information.

Separation techniques such as TLC (1, 2), HPLC (3–7), GC (6), and high-performance capillary electrophoresis (5) have been recommended for the QC of plant material and for standardization of herbal formulations in European and other pharmacopeias. The use of high-speed counter-current

chromatography for the fingerprinting of herbal medicines has also been reported (8). With the growing tendency to apply natural products, future fingerprinting will involve an even greater number of relevant analytical techniques.

Different species from the *Salvia* genus are widely distributed all over the world and commonly used in local traditional medicines due to a broad spectrum of biological activities, including antioxidant, antiplatelet, antitumor, antiviral, and other curative properties. Classification of the different *Salvia* species has been very confusing over the years. Many different species resemble one another, and many of them appear in varieties that have been given different specific names (9).

Currently, fingerprinting of plant extracts is the most widespread strategy in the chemical analysis of plant material. This is due to several limitations in total identification of plant constituents. The main problem is caused by an unknown composition of a given plant, and one should be aware that, so far, many compounds naturally occurring in biological material have been neither identified nor synthesized under laboratory conditions. Another acute problem is caused by the high cost of phytochemical standards. Fingerprints, i.e., chromatographic profiles derived from plant extracts, can provide a sufficient basis for differentiation of plants, their chemotaxonomic comparison, identification within a given family, etc. With dynamic development of hyphenated LC techniques, the quality of available fingerprints is steadily growing.

Several examples of the *Salvia* fingerprints can be found throughout the literature (7, 8, 10–12). Most papers focus on developing chromatographic profiles of *S. miltiorrhiza*, a traditional Chinese medicinal herb used for treating coronary heart disease, hepatitis, or insomnia. However, no chromatographic method has been established for a comparative analysis of the different *Salvia* species, especially those recorded in the flora of Europe. Most established methods focus on defining the acceptance criteria for one species only. For chemotaxonomic research and wider comparative studies, the development of a new approach is needed.

Among the HPLC methods for analyzing bioactive components of the *Salvia* species, UV detection with a diode

Guest edited as a special report on "Modern High Performance Column Liquid Chromatography in the Analysis of Phytochemicals" by Monika Waksmundzka-Hajnos.

¹ Corresponding author's e-mail: teresa.kowalska@us.edu.pl

Table 1. Basic characteristics of the investigated herbal material

Sample No.	Sage species	Harvesting year
1	<i>S. officinalis</i>	2007
1a	<i>S. officinalis</i>	2008
2	<i>S. officinalis</i> ^a	2008
3	<i>S. jurisicii</i>	2007
3a	<i>S. jurisicii</i>	2008
4	<i>S. triloba</i>	2007
4a	<i>S. triloba</i>	2008
5	<i>S. azurea</i>	2007
5a	<i>S. azurea</i>	2008
6	<i>S. forskahlei</i>	2007
6a	<i>S. forskahlei</i>	2008
7	<i>S. nemorosa</i>	2007
7a	<i>S. nemorosa</i>	2008

^a Sample originating from the natural habitat in the Zlatibor region of central Serbia.

array detector (DAD) is used most often (13–16). Application of HPLC/MS has also been reported (12, 17, 18). The coulometric electrode array system was used for the detection of water-soluble compounds in *S. miltiorrhiza* (11, 19). Recently, an online coupled HPLC-DAD-evaporative light-scattering detector (ELSD) method has been attracting increased interest and has been successfully applied for simultaneous quantification of multicomponent herbal medicines (15, 16). This method seems particularly well suited for the routine analysis and quality evaluation of herbal medicines.

The operating principle of a DAD is based on the solute's absorption of UV light, and the response of this selective detector is in proportion to the ability of a given component to absorb UV light. To the contrary, the ELSD can be classified as a universal detector. Its operating principle is based on the Rayleigh light scattering of nonvolatile solute molecules, and the detector's response is in proportion to the mass of the solute present in the analyzed sample. Thus, the DAD and ELSD signals provide mutually complementary information. The sensitive DAD detector reveals the UV-absorbing compounds, while the versatile ELSD detector reveals practically all compounds and provides a stable baseline even in the case of gradient elution (20).

To better explore the advantages of parallel use of the two HPLC detectors in phytochemical analysis, we carefully selected six sage species. Because of its recognized curative potential and an established position in traditional European medicine, *S. officinalis* was selected as the reference plant. Among the remaining five sage species, two plants (*S. jurisicii* and *S. triloba*) were already recognized in our earlier study as rich in methanol-soluble constituents (basically, phenolic acids and flavonoids), and in a certain way they resembled *S. officinalis* (21). In the same study, three other plants

(*S. azurea*, *S. forskahlei*, and *S. nemorosa*) demonstrated low quantities of the methanol-soluble constituents. Thus, it was particularly interesting to compare binary fingerprints obtained with use of the DAD and ELSD for sage samples already known for their differentiated chemical composition. We collected experimental data for a comparison of the chemical composition of sage samples originating from two harvesting seasons (2007 and 2008), and used selected phytochemical standards (i.e., phenolic acids, flavonoids, and coumarin), which allowed identification and semiquantitative estimation of these particular compounds in the analyzed methanol extracts.

Experimental

Herbal Material

Samples of the six different sage species (*S. officinalis*, *S. jurisicii*, *S. triloba*, *S. azurea*, *S. forskahlei*, and *S. nemorosa*) investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in two harvesting seasons (August 2007 and June 2008). Botany specialists identified each investigated species, and voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University, Lublin, Poland. Plant material was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. The obtained dry material was stored in a refrigerator until commencement of the analysis. A seventh sample was *S. officinalis*, which originated from the natural habitat in the Zlatibor region of central Serbia. It was harvested in the summer of 2008 and was purchased dried. Summarized information about the investigated herbal material is given in Table 1.

Accelerated Solvent Extraction (ASE)

A 5 g portion of each sage species was weighed, powdered in a porcelain mortar, and placed in the cell of a Model 200 ASE unit (Dionex, Sunnyvale, CA). Compounds of interest (flavonoids and phenolic acids) were extracted from the herbal material by ASE in a two-step extraction procedure. In the first step, sage samples were extracted for 20 min with *n*-hexane at 40°C in order to remove chlorophyll from the foliage, and the *n*-hexane extract was discarded. In the second step, the same sage samples were extracted for 12 min with methanol at 100°C. Both extraction steps were carried out under a pressure of 65 atm. The plant ASE procedure was elaborated by our research group earlier (22).

Each extract obtained with use of the ASE apparatus was evaporated to dryness in a stream of air; then 5 mL methanol was added to the dry residue. Vials with dry residue and 5 mL methanol were ultrasonicated for 15 min in a model RK 255H Sonorex Super ultrasonication bath (Bandelin, Berlin, Germany). Finally, the contents of each vial were condensed by evaporation of the excess methanol to a volume of 1 mL. Extracts were filtered through an Anotop syringe filter with aluminium oxide adsorbent (Merck, Darmstadt, Germany; Cat. No. 11320), and the samples were ready for HPLC analysis. Sample aliquots used were 10 µL.

Table 2. Phytochemical standards used for identification of the components of the methanol extracts from the investigated sage samples and their respective retention times

Standard No.	Standard compound	Retention time (t_R), min
1	Chlorogenic acid	5.57
2	Protocatechuic acid	5.92
3	Aesculetin	6.41
4	Caffeic acid	6.48
5	Scopoletin	7.47
6	<i>trans-p</i> -Coumaric acid	7.76
7	Ferulic acid	7.84
8	Rosmarinic acid	7.85
9	Coumarin	10.01
10	<i>o</i> -Coumaric acid	10.73
11	Luteolin	16.55
12	Gallic acid	16.56
13	Kaempferol	16.57
14	<i>trans</i> -Cinnamic acid	18.04

HPLC-DAD and HPLC-ELSD

HPLC analysis was carried out with a Varian 920-LC model liquid chromatograph (Harbor City, CA) equipped with a 900-LC model autosampler, gradient pump, 330 model DAD, 380-LC model ELSD, and the Galaxie software for data acquisition and processing. Due to the sequential order of the DAD and ELSD, the retention times of the respective sample constituents, as shown by the second (ELSD) detector, had to be normalized. The analyses were carried out in the gradient mode using a Pursuit C18 (5 μ m particle size) column (250 \times 4.6 mm id; Varian; Cat. No. 1215-9307). Methanol (A) and water (with a trace amount of glacial acetic acid; B) were used in the following gradient program (v/v): 0–15 min, A + B, 50 + 50; 15–16 min, A + B, 80 + 20; 16–25 min, A + B, 80 + 20; 25–26 min, A + B, 90 + 10; 26–45 min, A + B, 90 + 10; 45–46 min, A + B, 100 + 0; and 46–57 min, A + B, 100 + 0. The flow rate was 0.6 mL/min.

Partial identification of the components of the examined methanol extracts derived from the seven different sage samples was performed with the use of the 14 phytochemical standards listed in Table 2. All of these standards were manufactured by ChromaDex (Irvine, CA), and most were purchased as the secondary purity grade or reagent purity grade standards. For identification purposes, they were applied in 10 μ L aliquots as methanol solutions with concentrations equal to 0.5 mg/mL each. Identification was based on a comparison of the retention time (t_R) values and the UV spectra of the standards with those of the selected components of the extracts considered. Because most of the standards were not primary purity grade, assessment of the

contents of the individual compounds in the sage extracts, although based on the respective calibration curves prepared from eight standard concentrations, can be considered as semiquantitative only.

Results and Discussion

Calibration curve correlation coefficients ranged from 0.990 to 0.995, with the respective SD values always below 2.0%. The respective LOD and LOQ values evaluated for each determined substance contained in each sage species were equal to 0.2 and 1.0 mg/100 g dry mass, respectively. Due to the comparative nature of this study, recoveries of the identified sage constituents were not evaluated, and it was assumed that they were equal for all of the sage species considered.

Table 3 shows the presence or absence of the 14 different compounds (which include phenolic acids, flavonoids, and coumarin) in the investigated methanol extracts, and furnishes semiquantitative information on the contents in each analyzed sample. From the results given in Table 3, certain conclusions can be drawn as to seasonal differences with the investigated sage species. The absence of the three common compounds (aesculetin, ferulic acid, and kaempferol) in each investigated extract can be seen, but this does not necessarily mean an absolute absence of these compounds from the plant material. There are at least two possible reasons why these particular compounds could have been present and yet remained undetected in the analyzed samples. Namely, the extracted quantities could have been present below the LOD of the applied analytical technique, and/or the three compounds of interest could have been present in the bonded form (e.g., as the respective glycosides and/or esters). Because only the nonhydrolyzed methanol extracts were used in our study, all possible glycosides and/or esters remained unsplit and, hence, did not yield the respective aglycones.

Compounds that appeared in all the investigated sage samples were chlorogenic acid, caffeic acid, and rosmarinic acid. Coumarin was detected in all the sage species except for *S. triloba*. Trace amounts of cinnamic acid (often at levels between the LOD and LOQ) were detected in all the sage species except for *S. jurisicii*. On the other hand, gallic acid was detected in *S. officinalis* alone. Luteolin was detected in *S. officinalis* originating from its natural habitat in southwestern Serbia and in *S. triloba*. Protocatechuic acid was detected in *S. azurea*, *S. forskaohlei*, and *S. officinalis*. Scopoletin was found in *S. azurea*, *S. jurisicii*, and *S. nemorosa*. *o*-Coumaric acid was detected in *S. nemorosa*, *S. officinalis*, and *S. triloba*, and *trans-p*-coumaric acid in *S. azurea*, *S. forskaohlei*, *S. officinalis*, and *S. triloba*. Sage samples with the highest amounts of the seven identified compounds were *S. officinalis* and *S. nemorosa*, both harvested in 2008. From the chemotaxonomic point of view, it is noteworthy that in the sample of *S. officinalis* originating from a distant natural habitat in Serbia, the same compounds were detected as in the tested specimens originating from the Pharmacognosy Garden in Lublin, Poland, except for luteolin, which was detected in the Serbian *S. officinalis* alone.

Table 3. Qualitative and semiquantitative comparison of six different *Salvia* species in terms of the identified phenolic acids, flavonoids, and coumarin, and in terms of the harvesting season (2007 and 2008)

Species	Year	Standard													
		Chlorogenic acid	Protocatechuic acid	Aesculetin	Caffeic acid	Scopoletin	trans-p-Coumaric acid	Ferulic acid	Rosmarinic acid	Coumarin	o-Coumaric acid	Luteolin	Gallic acid	Kaempferol	trans-Cinnamic acid
No.															
Contents, mg/100 g dry mass															
<i>S. azurea</i>	2007	0.146	0.081	n.f. ^a	0.098	0.072	0.006	n.f.	n.f.	0.002	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.000
	2008	0.209	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.081	n.f.	0.193	0.008	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
<i>S. forskaohlei</i>	2007	0.101	0.033	n.f.	0.060	n.f.	0.071	n.f.	n.f.	0.004	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
	2008	0.114	n.f.	n.f.	0.031	n.f.	n.f.	n.f.	0.228	0.007	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.001
<i>S. jurisicii</i>	2007	0.104	n.f.	n.f.	0.018	0.054	n.f.	n.f.	0.058	0.007	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
	2008	0.129	n.f.	n.f.	n.f.	0.056	n.f.	n.f.	0.030	0.008	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
<i>S. nemorosa</i>	2007	0.081	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	0.153	0.005	0.008	n.f.	n.f.	n.f.	0.000
	2008	0.116	n.f.	n.f.	0.054	0.238	n.f.	n.f.	0.251	0.007	0.013	n.f.	n.f.	n.f.	0.001
<i>S. officinalis</i>	2007	0.141	0.037	n.f.	0.091	n.f.	n.f.	n.f.	0.210	0.004	0.022	n.f.	n.f.	n.f.	0.001
	2008	0.075	0.021	n.f.	0.031	n.f.	0.042	n.f.	0.139	n.f.	n.f.	n.f.	0.014	n.f.	n.f.
<i>S. triloba</i>	2008 ^b	0.135	n.f.	n.f.	0.012	n.f.	n.f.	n.f.	0.163	0.016	0.033	0.002	n.f.	n.f.	0.001
	2007	0.110	n.f.	n.f.	0.081	n.f.	0.069	n.f.	0.211	n.f.	0.016	n.f.	n.f.	n.f.	0.001
	2008	0.102	n.f.	n.f.	0.052	n.f.	0.241	n.f.	0.282	n.f.	n.f.	0.001	n.f.	n.f.	0.000

^a n.f. = Not found; LOD: 0.2 mg/100 g dry mass; and LOQ: 1 mg/100 g dry mass.^b Sample originating from the natural habitat in the Zlatibor region of central Serbia.

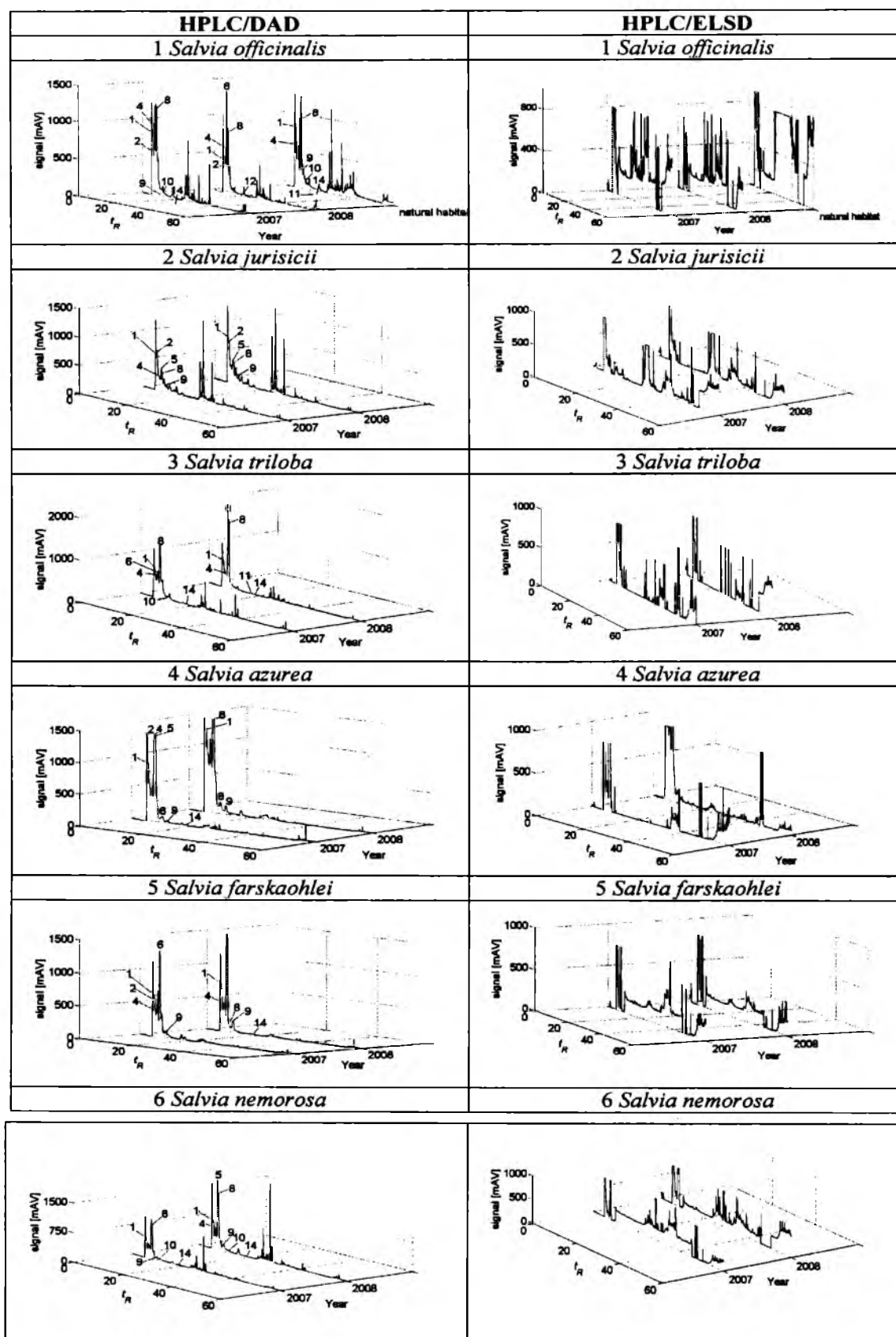


Figure 1. A comparison of the DAD and ELSD fingerprints for the six different sage species. (1) *S. officinalis*; (2) *S. jurisicii*; (3) *S. triloba*; (4) *S. azurea*; (5) *S. farskaohlei*; and (6) *S. nemorosa*. Numbering of the identified constituents of the methanol extracts is in conformity with Table 2.

Seasonal differences between the investigated sage species harvested in 2007 and 2008 were observed as different yields of the identified compounds, yet it would be hardly possible to trace any definable regularity in this respect. Certain components of the methanol extracts were more abundant in the samples harvested in 2008, while the other compounds gave higher yields in 2007. One (although most probably not the single) reason for this apparent lack of regularity could be that the 2007 plants were harvested in August and the 2008 plants in June.

The main aim of this study was to compare binary fingerprints of the six sage species recorded with the use of the DAD and ELSD, each of which furnishes different information about an analyzed sample. The DAD fingerprints selectively give information about the contents of the compounds that absorb UV light, and the ELSD fingerprints give information about the total composition of the analyzed samples. Hence, one should expect that the fingerprints recorded by the ELSD are richer both in qualitative and quantitative terms than those recorded by the DAD. Figure 1 provides a comparison of the DAD and ELSD fingerprints obtained for the sage species investigated in this study.

A few conclusions can be drawn from visual inspection of the sage fingerprints given in Figure 1. First, it is evident that in spite of seasonal differences in the yields of the individual extracted components, each species has its two distinct fingerprints originating from use of the DAD and ELSD that cannot be mistaken for those of the other species. Second, in an agreement with operating principles of the two different HPLC detectors, fingerprints that originated from the ELSD have a considerably richer content than those originating from the DAD. However, the outstanding ability of ELSD to record total chromatograms can on certain occasions be a somewhat confusing drawback, e.g., in the case of phytochemical standards of the secondary purity grade. With several secondary standards used in this study, the DAD recorded a single peak only, whereas the ELSD recorded two, or even three, peaks. In the latter case and without the help of the DAD, it would have been virtually impossible to decide which peak in the ELSD fingerprint really represents the phytochemical standard, and which peaks represent its contaminants.

It is obvious that binary fingerprints better characterize a given botanical species than does a single one. Visual inspection alone is, in most cases, insufficient to extract the wealth of relevant (i.e., chemical, chemotaxonomic, etc.) information even from a single fingerprint. In fact, chemometric decoding of this information is often needed, as was demonstrated earlier (23). Our future efforts focused on the *Salvia* genus aimed at establishing chemotaxonomic classification of its members will certainly involve binary (DAD and ELSD) fingerprints of the respective plant extracts.

Acknowledgments

The work of Dorota Staszek and Łukasz Wojtal was partially supported by the Ph.D. scholarship granted to them

in 2009 within the framework of the university as a Partner of the Economy Based on Science project subsidized by the European Social Fund of the European Union.

References

- (1) Di, X., Chan, K.K.C., Leung, H.-W., & Huie, C. W. (2003) *J. Chromatogr. A* **1018**, 85–95
- (2) Gu, M., Su, Z., & Ouyang, F. (2006) *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **29**, 1503–1514
- (3) Ji, Y.-B., Xu, Q.-S., Hu, Y.-Z., & Vander Heyden, Y. (2005) *J. Chromatogr. A* **1066**, 97–104
- (4) Katalinic, V. (1997) *J. Chromatogr. A* **775**, 359–367
- (5) Wang, L.C., Cao, Y.H., Xing, X.P., & Ye, J.N. (2005) *Chromatographia* **62**, 283–288
- (6) Li, Y., Hu, Z., & He, L. (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 1667–1672
- (7) Jin, X.-F., Lu, Y.-H., Wei, D.-Z., & Wang, Z.-T. (2008) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 100–104
- (8) Gu, M., Zhang, G., Su, Z., & Ouyang, F. (2004) *J. Chromatogr. A* **1041**, 239–243
- (9) Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J., & Wink, M. (2004) *Am. J. Bot.* **91**, 1115–1125
- (10) Gu, M., Zhang, S., Su, Z., Chen, Y., & Ouyang, F. (2004) *J. Chromatogr. A* **1057**, 133–140
- (11) Ma, L., Zhang, X., Zhang, H., & Gan, Y. (2007) *J. Chromatogr. B* **846**, 139–146
- (12) Liu, A.H., Lin, Y.H., Yang, M., Guo, H., Guan, S.H., Sun, J.H., & Guo, D.A. (2007) *J. Chromatogr. B* **846**, 32–41
- (13) Shi, Z., He, J., Yao, T., Chang, W., & Zhao, M. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**, 481–486
- (14) Veitch, N.C., Grayer, R.J., Irwin, J.L., & Takeda, K. (1998) *Phytochemistry* **48**, 389–393
- (15) Lu, Y., Yu, K., Qu, H.B., & Cheng, Y.Y. (2007) *Chromatographia* **65**, 19–24
- (16) Wie, Y.-J., Qi, L.-W., Li, P., Luo, H.-W., Yi, L., & Sheng, L.-H. (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 775–784
- (17) Dal Piaz, F., Imparato, S., Lepore, L., Bader, A., & De Tommasi, N. (2010) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 70–77
- (18) Zhao, Y., Chen, B., & Yao, S. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 564–570
- (19) Ma, L., Zhang, X., Guo, H., & Gan, Y. (2006) *J. Chromatogr. B* **833**, 260–263
- (20) Markowski, W., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2010) in *HPLC in Phytochemical Analysis*, M. Waksmundzka-Hajnos & J. Sherma (Eds), CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, in press
- (21) Cieśla, L., Hajnos, M., Staszek, D., Wojtal, Ł., Kowalska T., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2010) *J. Chromatogr. Sci.* **48**, 421–427
- (22) Grygierczyk, G., Sajewicz, M., Staszek, D., Wojtal, Ł., Waksmundzka-Hajnos, M., & Kowalska, T. (2009) *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **32**, 1223–1240
- (23) Daszykowski, M., Sajewicz, M., Rzepa, J., Hajnos, M., Staszek, D., Wojtal, Ł., Kowalska, T., Waksmundzka-Hajnos, M., & Walczak, B. (2009) *Acta Chromatogr.* **21**, 513–530

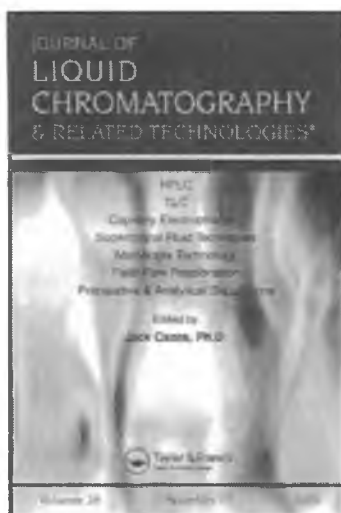
This article was downloaded by: [University of Silesia/Uniwersytet Slaski]

On: 18 May 2011

Access details: Access Details: [subscription number 934018205]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713597273>

TLC-MS VERSUS TLC-LC-MS FINGERPRINTS OF HERBAL EXTRACTS. PART II. PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS

Mieczysław Sajewicz^a; Dorota Staszek^a; Maja Natić^{a,b}; Łukasz Wojtal^a; Monika Waksmundzka-Hajnos^c; Teresa Kowalska^a

^a Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland ^b Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia ^c Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

Online publication date: 17 May 2011

To cite this Article Sajewicz, Mieczysław , Staszek, Dorota , Natić, Maja , Wojtal, Łukasz , Waksmundzka-Hajnos, Monika and Kowalska, Teresa(2011) 'TLC-MS VERSUS TLC-LC-MS FINGERPRINTS OF HERBAL EXTRACTS. PART II. PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS', Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 34: 10, 864 — 887

To link to this Article: DOI: 10.1080/10826076.2011.571131

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2011.571131>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

TLC-MS VERSUS TLC-LC-MS FINGERPRINTS OF HERBAL EXTRACTS. PART II. PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS

Mieczysław Sajewicz,¹ Dorota Staszek,¹ Maja Natić,^{1,2} Łukasz Wojtal,¹
Monika Waksmundzka-Hajnos,³ and Teresa Kowalska¹

¹Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

²Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

³Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

□ In the previous paper from this series, we proposed mass spectrometric fingerprinting of a complex and volatile botanical sample upon an example of the essential oil derived from *Salvia lavandulifolia*. In that paper, we compared two variants of fractionation of such a mixture. A simpler one-dimensional variant consisted of the low-temperature thin-layer chromatographic fractionation coupled with mass spectrometric fingerprinting of each separated fraction (1D LT TLC-MS). A more sophisticated variant was the two-dimensional liquid chromatographic system composed of the low-temperature thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, and mass spectrometric detection (2D LT TLC-LC-MS). In this study, we present an analogous approach to the non-volatile botanical mixtures upon an example of the pharmacologically important phenolic acids and flavonoids selectively extracted from *Salvia lavandulifolia*. With these non-volatile fractions, the thin-layer chromatographic separations were carried out at ambient temperature ($21 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Once again, we compared two variants of fractionation. A simpler one-dimensional variant consisted of the thin-layer chromatographic mode coupled with mass spectrometric fingerprinting of each separated fraction (1D TLC-MS). A more sophisticated variant was the two-dimensional liquid chromatographic system composed of the thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography, with mass spectrometric detection (2D TLC-LC-MS). As expected, the two-dimensional mode proved better performing than the one-dimensional mode (1D TLC-MS). It was concluded that thin-layer chromatography directly or indirectly coupled with mass spectrometric detection can prove very useful in the analysis of the phenolic acid and flavonoid fraction selectively extracted from botanical material.

Keywords flavonoids, mass spectrometric fingerprinting, phenolic acids, *Salvia lavandulifolia*, TLC-LC-MS, TLC-MS

INTRODUCTION

Mass spectrometric detector can be off-line coupled with the thin-layer chromatographic plate by means of the TLC-MS interface (CAMAG, Muttenz, Switzerland). In that way, TLC gains an additional analytical and fingerprinting dimension which enhances its performance, thus becoming an even more flexible and better performing separation and identification tool than before. With use of the TLC-MS interface, a certain amount of analytical tasks has already been accomplished, basically focused on the separation of the less complicated mixtures of compounds and identification thereof upon their molecular ions. A considerable contribution to this area has been done by Morlock et al. (e.g.,^[1-6]). Research^[7] was made on the one-dimensional low-temperature thin-layer chromatography with mass spectrometric detection (1D LT TLC-MS), which for the first time applied samples derived from several sage (*Salvia*) species to the fingerprinting of the complex essential oil. In other research,^[8] a novel possibility was introduced of the two-dimensional chromatographic mode making use of the TLC-MS interface and application to the fingerprinting of the essential oil extracted from *Salvia lavandulifolia*. This novel approach combined the low-temperature normal-phase thin-layer chromatography (silica gel stationary phase) and the reversed-phase high-performance liquid chromatography (C₁₈ stationary phase) with mass spectrometric detection (2D LT TLC-LC-MS). In the same paper,^[8] a comparison was made of the 1D and 2D chromatography modes, both employing the thin-layer chromatography and mass spectrometric detection. The authors pointed to the considerable fingerprinting advantages of the two-step liquid chromatographic separation (TLC/HPLC) combined with the mass spectrometric detection that outperforms the one-step TLC-MS separation and fingerprinting, even if the two-step mode still does not provide full separation of a complex mixture to the individual chemical species.

It is the aim of this study to compare the 1D TLC-MS separation and fingerprinting mode with the 2D TLC-LC-MS one, when applied to the phenolic acids and flavonoids fractions selectively extracted from *Salvia lavandulifolia*. The chemical nature of phenolic compounds of sage origin is obviously different from that of essential oils, and phenolics are widely recognized for their antioxidant, antimicrobial, antiviral, and even anti-cancer properties. For this reason, it is necessary to check in a separate experiment, if 1D TLC-MS and 2D TLC-LC-MS can be applied to these pharmacologically important secondary metabolites of the plant origin.^[9] Successful fingerprinting can prove particularly helpful for identification and quality assurance operations, especially when handling commercial batches of medicinal plants traded in a powdered form.

EXPERIMENTAL

Materials and Reagents

Sample of the *Salvia lavandulifolia* species was harvested in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in July, 2009. The plant material comprised all parts of the plant (i.e., roots and the aerial parts) and it was dried for 40 hr in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. Then the obtained dry material was stored in the deep-freeze compartment of refrigerator until the commencement of the analysis. Finally, the necessary amounts of the plant material were weighed and powdered in a mechanical grinder. Three replicates of the sage sample were processed in an identical way.

Metenamine was purchased from Pharma Cosmetics (Cracow, Poland), and methanol, toluene, acetone, ethyl acetate, acetic acid, formic acid, and hydrochloric acid used for the experiments were of analytical purity grade and purchased from POCh (Gliwice, Poland). Water was double distilled and de-ionized in the laboratory conditions by means of Elix Advantage model Millipore system (Molsheim, France).

Selective Extraction of Phenolic Acids From the *Salvia* Species

Ten grams of the finely powdered plant material was placed in the 250-mL round-bottomed flask on the water bath under the reflux and the sample was three times extracted with the consecutive 50-mL portions of methanol. The methanol extracts were combined and then evaporated under the reduced pressure to dryness. Dry residue was dissolved in 20 mL hot water and then left in the refrigerator for 24 hr. Finally, the precipitate was filtered off, and the filtrate was placed in volumetric flask and made up to 100 mL with water.

Selective Extraction of Flavonoids From the *Salvia* Species

Stock solution was prepared from 1 g medium powdered crude plant material. To this plant material, 20 mL acetone, 2 mL HCL (281 g L^{-1}), and 1 mL metenamine (5 g L^{-1}) was added. The entity was kept boiling on the water bath under the reflux for 30 min. Hydrolysate was filtered to the volumetric flask (100 mL). The separated plant material was extracted for the second and the third time with the 20-mL portions of acetone and kept boiling for 10 min. All extracts were filtered in the same volumetric flask and acetone was added to make up to 100 mL. Then, 20 mL of the obtained solution was transferred to the separation funnel, 20 mL water was added, and the entity was extracted with ethyl acetate

(firstly with the 15-mL, and then three times with the 10-mL portions of ethyl acetate). The separated organic layers were collected jointly and twice washed with the 40-mL portions of water. The organic layer was filtered to the 50-mL volumetric flask and filled up to the volume with ethyl acetate.

Thin-Layer Chromatography with Densitometric Detection (TLC-Densitometry)

Thin-layer chromatographic separations were performed in the normal-phase mode on commercial glass plates (10 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. no. 1.05729). The phenolic acid flavonoid extracts and the respective standards were spotted onto the thin layer in the 10-μL aliquots, using an AS 30 model autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany).

Development of the planar chromatograms was carried out at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for a distance of 15 cm. The phenolic acid extracts were developed with the ternary mixture ethyl acetate–toluene–formic acid, 7:3:1 (*v/v*), and the flavonoid extracts were developed with the ternary mixture ethyl acetate–toluene–formic acid, 5:5:0.1 (*v/v*). All planar chromatograms were developed in the sandwich DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland), previously saturated with mobile phase vapor for 15 min.

The developed chromatograms were dried for 3 hr at ambient air and eventually evaluated by means of densitometry. Acquisition of the densitograms was carried out with a Desaga CD 60 model densitometer equipped with Windows compatible ProQuant software (Desaga). Concentration profiles of the development lanes for the investigated *Salvia lavandulifolia* extracts were recorded in reflected ultraviolet (UV) light from a mercury lamp. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm × 0.1 mm. Each TLC analysis was performed in triplicate. Then, the developed and scanned chromatographic plates were utilized at the next experimental step, which was either direct analysis of the separated chromatographic bands with use of mass spectrometer (TLC-MS), or an indirect analysis of these bands by further separating them with use of high-performance liquid chromatography followed by mass spectrometric detection (TLC-LC-MS).

As in the study presented in research,^[8] application of TLC-densitometry was an indispensable initial step in each of the procedures introduced in this study. First, it enabled group separation of complex mixtures contained in the investigated samples into several less complex mixtures. Second, it allowed localization of the separated chromatographic bands on the plate surface. Consequently, positions of individual chromatographic bands could be marked on the adsorbent surface, indicating the areas for the consecutive elution with use of the TLC-MS interface.

Thin-Layer Chromatography with Mass Spectrometric Detection (TLC-MS)

The first chromatographic mode assumed in this study consisted of a direct elution of a given band from the chromatographic plate with use of the TLC-MS interface (CAMAG), which enabled an introduction of a given band to mass spectrometer. This mode is referred to as the thin-layer chromatography with mass spectrometric detection (TLC-MS) and it has been devised to fingerprint the preliminarily fractionated complex mixture of compounds (e.g., of botanical origin).

In this study, elution was carried out at ambient temperature either with use of pure methanol, or methanol + acetic acid, 99.5:0.5, *v/v* (the flow rate equal to 0.2 mL min⁻¹). The eluate was directly introduced to the Varian 500-MS model mass spectrometer (Varian, Harbor City, CA, USA) and the samples were analyzed in the ESI mode (full ESI-MS scan, negative ionization with phenolic acids, positive ionization with flavonoids, spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 200°C, drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 80 V, needle voltage 5 kV). Varian MS Workstation v. 6.9.1 software was used for data acquisition and processing.

Thin-Layer Chromatography-Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection (TLC-LC-MS)

The second chromatographic mode was aimed at the more sophisticated mass spectrometric fingerprinting of the phenolic acid and flavonoid extracts derived from the sage species. Owing to the TLC-MS interface, we developed the two-dimensional liquid chromatography system equipped with mass spectrometric detection, off-line coupling the thin-layer chromatographic system with the high-performance liquid chromatograph (TLC-LC).^[8] In this two-dimensional system, the TLC part provides preliminary group separation of the investigated extracts, with individual separated fractions one by one transported with aid of the TLC-MS interface not directly to mass spectrometer, but to the high-performance liquid chromatograph first. Eventually, we used mass spectrometer as a detector, to obtain the TLC-LC-MS tandem system.

The working conditions of TLC-densitometry and MS employed in this second analytical mode were exactly the same as in the first mode. Liquid chromatographic analysis with mass spectrometric detection (LC-MS) was carried out using an LC-MS System Varian (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Varian ProStar model pump, Varian 100-MS mass spectrometer, and Varian MS Workstation v. 6.9.1 software for data acquisition and processing.

The LC analyses were carried out in the isocratic mode, using a Pursuit X R_s 3-C18 column (50 mm × 2.0 mm i.d.; Varian; cat. no. A6001050C020) and either pure methanol or methanol + acetic acid, 99.5:0.5 (v/v) as mobile phase at the flow rate of 0.20 mL min⁻¹. Mass spectrometric detection and processing of the obtained results were carried out using the same working parameters as those described in the preceding sub-section.

RESULTS AND DISCUSSION

Thin-Layer Chromatography with Mass Spectrometric Detection (TLC-MS) of Phenolic Acids

In Figure 1a–d, mass spectra are presented valid for bands 1–4, respectively, eluted from the chromatographic plate with the TLC-MS interface using methanol-acetic acid. Prior to a more detailed discussion of these results, let us make the following general statement. A large number of phenolic acids present in the sage extract are constructed from the caffeic acid building block,^[10] as it can easily be seen from Table 1. As it comes out from the literature,^[10] trimers derived from caffeic acid constitute the largest group of metabolites in *Salvia*. They include such compounds, as lithospermic acid (m.w. 538), sagecoumarin (m.w. 536), salvianolic acids H, I, J, and K, with their respective molecular weights equal to 531, 531, 526, and 555, and yunnaneic acids C, D, E, and F, with their respective molecular weights equal to 538, 540, 572, and 597.

In the mass spectra recorded for the individual chromatographic bands in our study eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate directly to the mass spectrometer, several signals can be observed with the m/z values corresponding to molecular weights of certain phenolic acids. For example, an intense m/z 360.56 signal present in Figure 1b can either originate from the caffeic acid dimers (with dimerization occurring under the ESI conditions, as caffeic acid is the building block for most phenolic acids of botanical origin), or it can be attributed to the molecular unit of rosmarinic acid. In Figure 1a, along with an intense m/z 388.80 signal (its possible origin is going to be discussed in the next section), the m/z 147.71 signal is also present, which can originate from the $[M-H]^-$ cinnamic acid derived ion. The same signal can also appear due to the fragmentation of certain phenolic acids (e.g., of ferulic, caffeic, and/or coumaric acid), which are in fact the cinnamic acid derivatives. The m/z 163.51 (Figure 1c) and m/z 194.05 (Figure 1d) signals can originate from coumaric acid and ferulic acid, respectively. At this point it has, however, to be admitted that phenolic acids presently discussed (i.e., chlorogenic, ferulic, *o*-coumaric, *p*-coumaric, caffeic, protocatechuic, and gallic acid) have not yet been identified in *Salvia lavandulifolia*, except for rosmarinic acid.^[10,11] We believe that in a forthcoming study^[12] we will

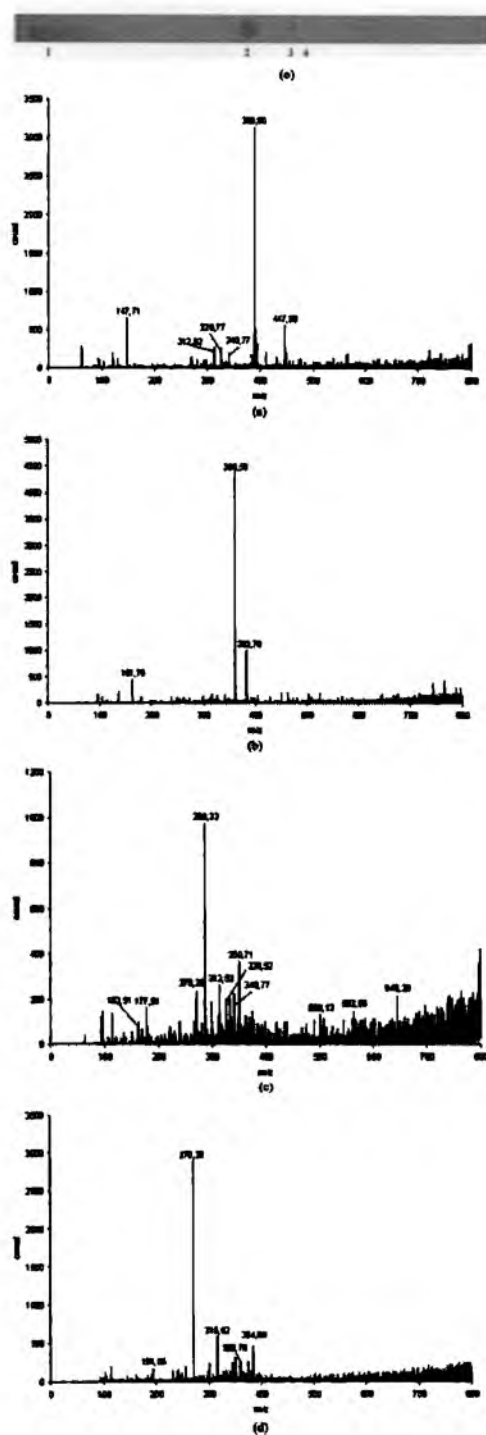
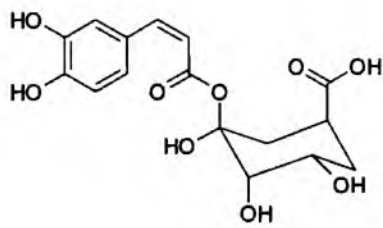
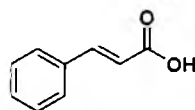
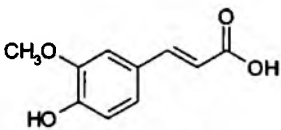
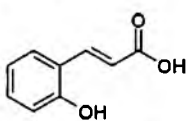
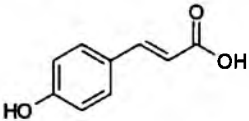
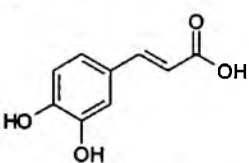
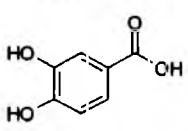
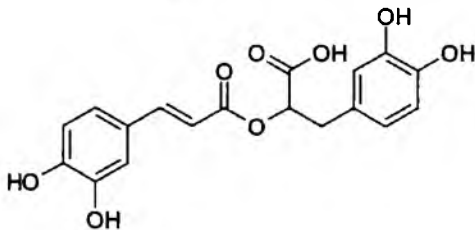


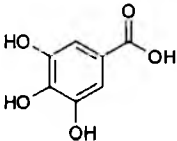
FIGURE 1 (a) The videoscan obtained from the analytical thin layer chromatogram developed for the phenolic acids fraction of *Salvia lavandulifolia* at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$, with the bands of interest indicated by numerals (1)–(4), and the mass spectra of (a) band 1, (b) band 2, (c) band 3, and (d) band 4 eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate. (Figure available in color online.)

TABLE 1 Selected Phenolic Acids Expected in the *Salvia* Genus Extracts, their Respective Structural Formulas and Molecular Weights^[10]

Compound	Structural Formula	Molecular Weight
Chlorogenic acid		354.31
<i>trans</i> -Cinnamic acid		148.17
Ferulic acid		194.18
<i>o</i> -Coumaric acid		164.16
<i>p</i> -Coumaric acid		164.16
Caffeic acid		180.16
Protocatechuic acid		154.12
Rosmarinic acid		360.31

(Continued)

TABLE 1 Continued

Compound	Structural Formula	Molecular Weight
Gallic acid		170.12

be able to ultimately answer the question whether our present interpretation of the registered mass spectra is correct and the aforementioned phenolic acids can really be found in the *Salvia lavandulifolia* samples.

Thin-Layer Chromatography-Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection (TLC-LC-MS) of Phenolic Acids

Liquid chromatograms recorded by means of the 2D TLC-LC-MS system for bands 1-4 eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate are presented in Figures 2-5o, with the positions of recording the individual mass spectra indicated by numerals 1 and 2.

Mass spectrum shown in Figure 2a and originating from the 2D TLC-LC-MS system (although apparently more complex than that shown in Figure 1a), greatly resembles the latter one. The intense m/z 388.90 signal can be attributed to a variety of molecular adducts, and for the sake of example, one can only mention the adduct of caffeic acid with cinnamic and acetic acid, or the ferulic acid dimer.

Figure 3a and b originate from the 2D TLC-LC-MS system and they present the mass spectra of the two constituents of the thin-layer chromatographic band 2, in the second dimension separated on the liquid chromatographic column. In these mass spectra, one can observe an intense m/z 360.5 signal, which is present also in the mass spectrum shown in Figure 1b.

In Figure 4a and b (originating from the 2D TLC-LC-MS system), not very intense signal at m/z 163.6 is visible that can be attributed to coumaric acid. The analogous signal is present in Figure 1c, showing the mass spectrum originating from the 1D TLC-MS system.

Thin-Layer Chromatography with Mass Spectrometric Detection (TLC-MS) of Flavonoids

The flavonoid extracts derived from *Salvia lavandulifolia* have also been studied using the normal-phase thin-layer chromatography (NP TLC) with silica gel as stationary phase and the non-aqueous mobile phase. The entity of the results valid for the flavonoids are given in Figs. 6-10.

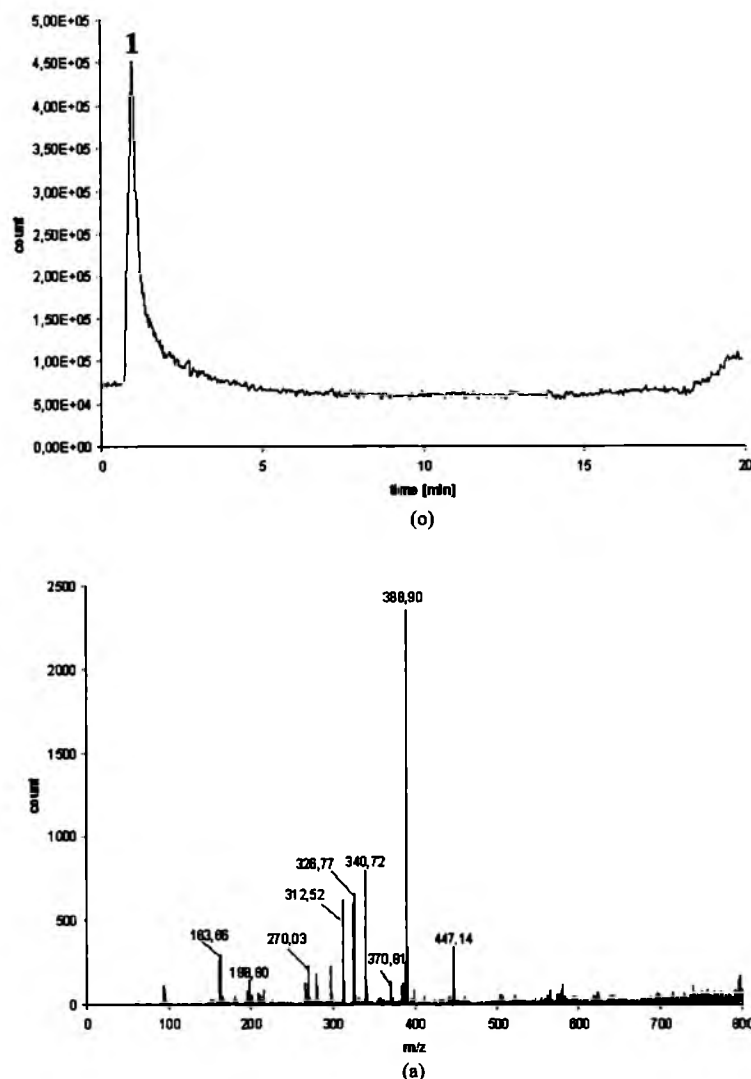


FIGURE 2 (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 1 (Figure 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numeral (1), and the mass spectrum of (a) peak 1 from the liquid chromatogram.

Flavonoids are widely distributed in the different plant species from the *Salvia* genus and they appear mostly as flavones and flavonols, and also as the respective glycosides thereof. In Table 2, we listed flavone and flavonol aglycones and glycosides characteristic of *Salvia lavandulifolia*, as reported in the review paper on the *Salvia* genus.^[10]

The majority of flavonoids present in the *Salvia* genus are derived from apigenin and luteolin, and from their respective 6-hydroxylated derivatives.

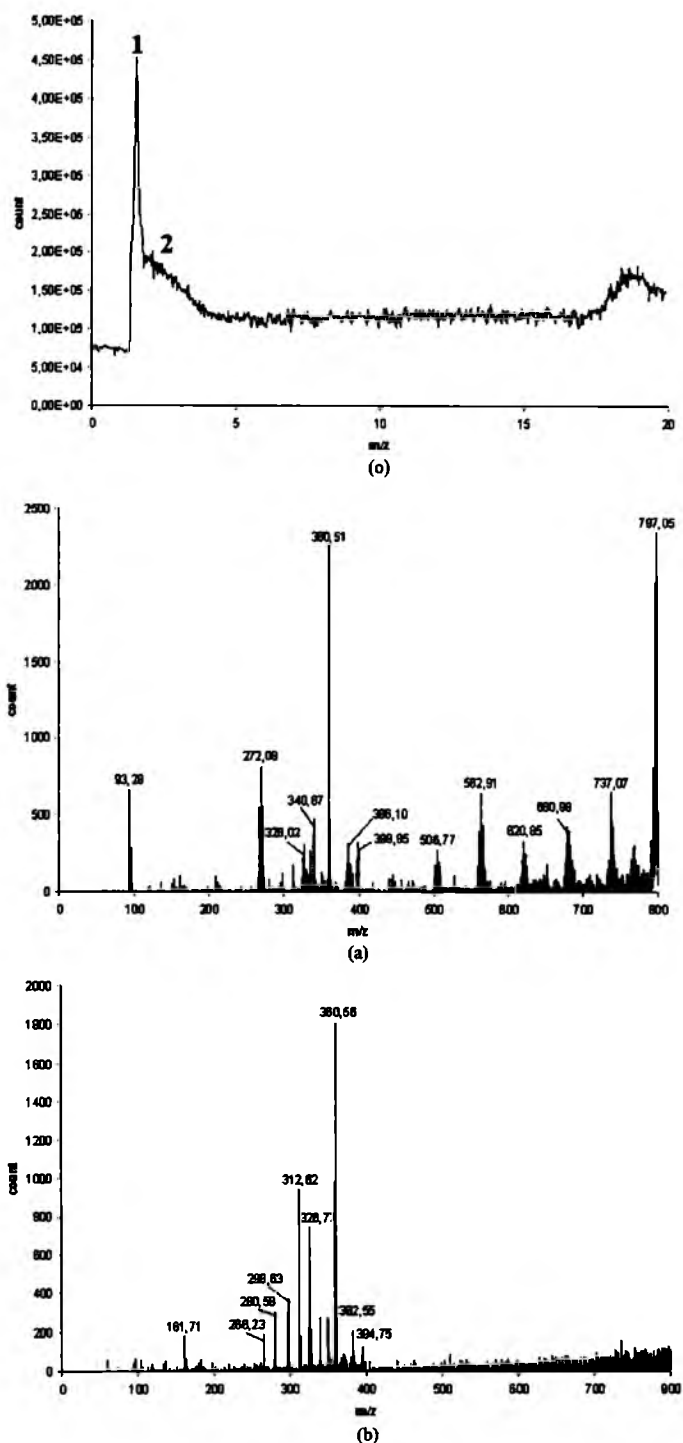


FIGURE 3 (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 2 (Figure 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1) and (2), and the mass spectra of (a) peak 1 and (b) peak 2 from the liquid chromatogram.

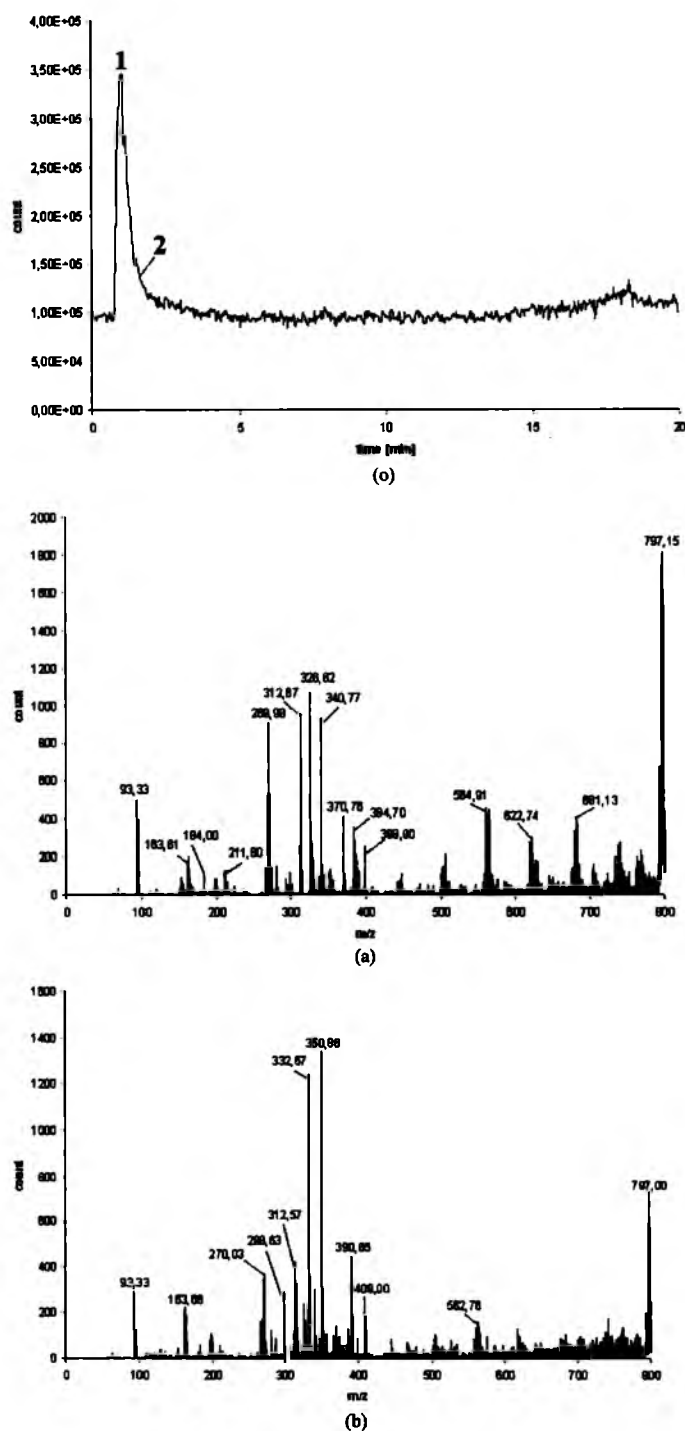


FIGURE 4 (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 3 (Figure 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1) and (2), and the mass spectra of (a) peak 1 and (b) peak 2 from the liquid chromatogram.

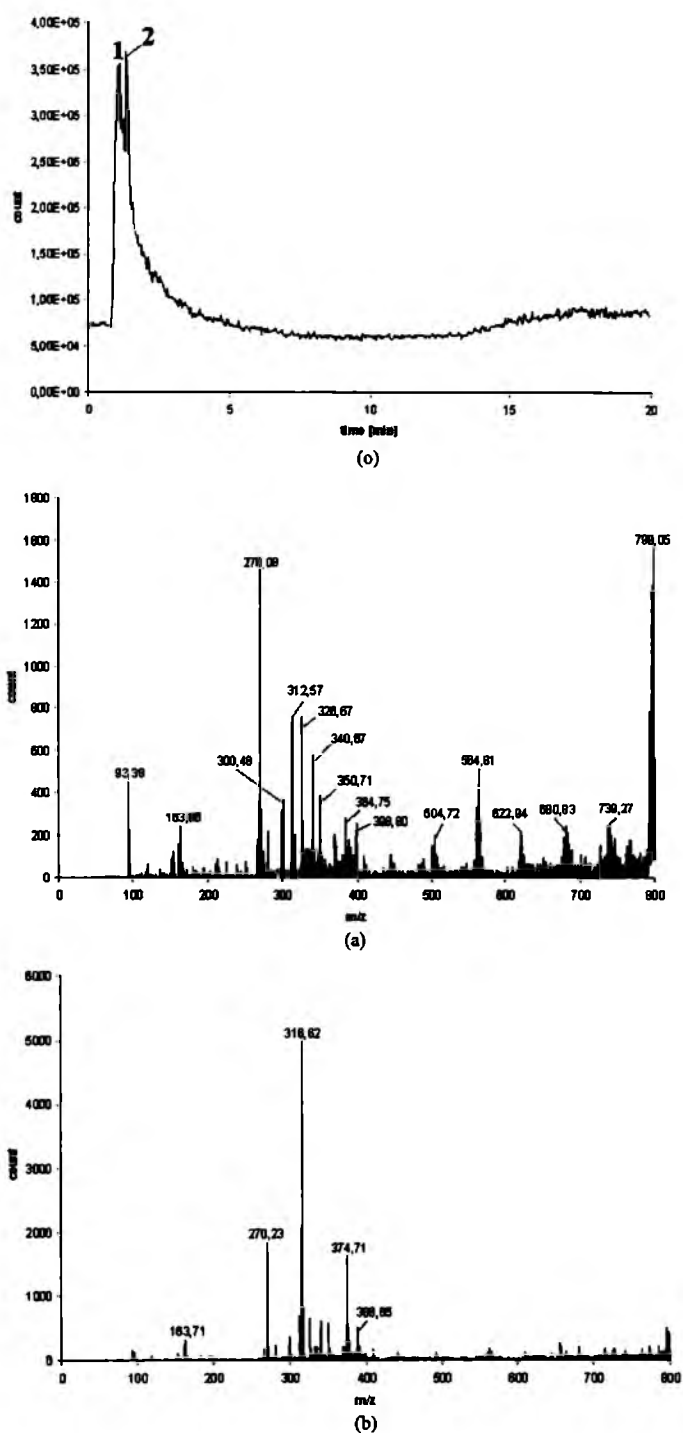
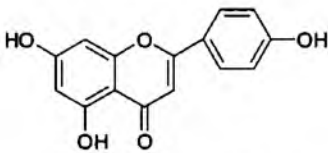
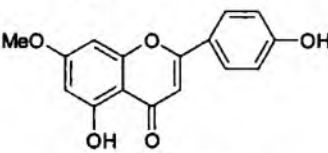
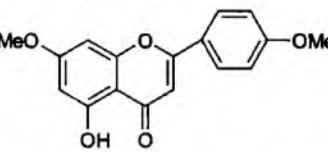
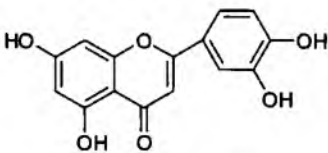
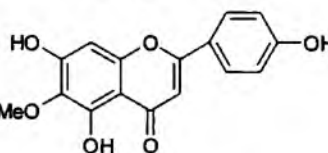
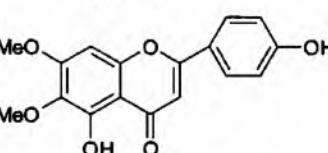
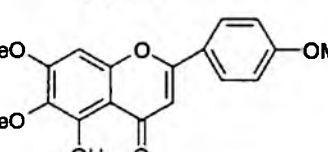
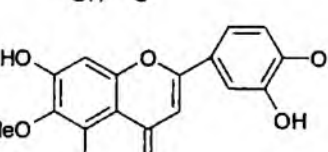


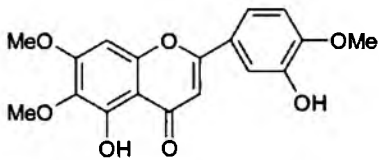
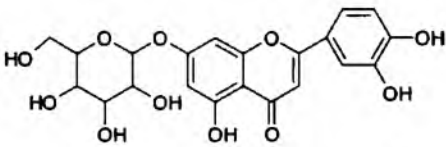
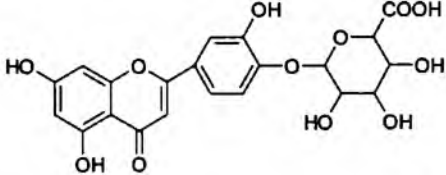
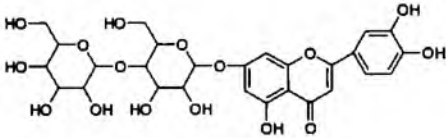
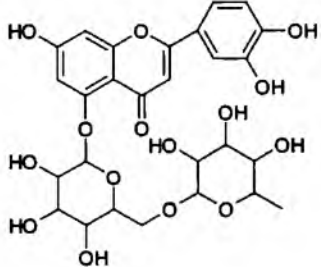
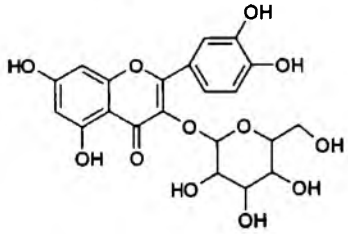
FIGURE 5 (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 4 (Figure 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1) and (2), and the mass spectra of (a) peak 1 and (b) peak 2 from the liquid chromatogram.

TABLE 2 Selected Flavone and Flavonol Aglycones and Glycosides Expected in the *Salvia lavandulifolia* Species, their Respective Structural Formulas and Molecular Weights^[10]

Compound	Structural Formula	Molecular Weight
Aglycone		
Apigenin		270.24
Apigenin-7-dimethylether (genkwanin)		284.27
Apigenin-7,4'-dimethyl ether		298.30
Luteolin		286.24
6-Hydroxyapigenin-6-methyl ether (hispidulin)		300.27
6-Hydroxyapigenin-6,7-dimethyl ether (cirsimaritin)		314.30
6-Hydroxyapigenin-6,7,4'-trimethyl ether (salvigenin)		328.32
6-Hydroxyluteolin-6-methyl ether (nepetin)		316.27

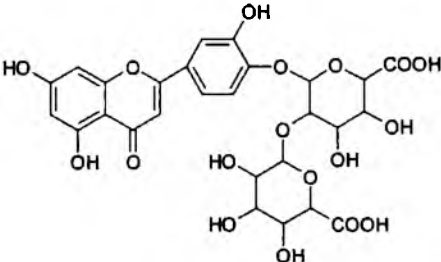
(Continued)

TABLE 2 Continued

Compound	Structural Formula	Molecular Weight
Eupatorin		344.32
Glycoside		
Luteolin-7-glucoside (cinaroside)		448.38
Luteolin-4'-glucuronide		462.08
Luteolin-7-cellobioside		628.54
Luteolin-5-rutinoside		594.16
Quercetin-3-glucoside (isoquercitrin)		464.38

(Continued)

TABLE 2 Continued

Compound	Structural Formula	Molecular Weight
4'- <i>O</i> -diglucuronil-luteolin		638.11

Kaempferol and quercetin, and also the derivatives thereof, are recognized as relatively widespread constituents of the *Salvia* genus, but the presence thereof has not been reported in *Salvia lavandulifolia*.^[10] Our own results seem to confirm this statement.

Among the flavone and flavonol glycosides, those derived from luteolin appear as relatively most common with the *Salvia* genus, and luteolin 7-glucoside (cinaroside) has been reported as occurring in *Salvia lavandulifolia*.

The TLC-MS results obtained in this study are given in Figure 6. The videoscans obtained from the analytical thin layer chromatogram developed for the flavonoids fraction of *Salvia lavandulifolia* is shown in Figure 6b. Bands of interest are indicated by numerals 1–4. In the selected mass spectra (Figure 6a–d), one can recognize the molecular ions characteristic of certain flavonoids listed in Table 2. These are the signals with the m/z values equal to 284.43 (genkwanin, Figure 6d), 316.22 (nepetin, Figure 6a), 464.93 (isoquercitrin, Figure 6a), and 595.35 (luteolin-5-rutinoside, Figure 6c).

Signal with the m/z value equal to 302.6 is present in all four mass spectra shown in Figure 6. To this value, a selection of molecular structures can be attributed which are basically adduct ions originating from the respective molecular ions combined with the H, He, or MeOH units. For the sake of example, $m/z = 302.6$ can characterize [apigenin + MeOH]⁺, [hispidulin + He]⁺, and the aglycon derived from [isoquercitrin + H]⁺. It cannot, however, be excluded that the discussed ion results from a fragmentation process also. Signals in the m/z range below 284 typically originate from the fragmentation processes.

Thin-Layer Chromatography-Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection (TLC-LC-MS) of Flavonoids

Unlike with TLC-MS, where no intense signals above the m/z value equal to 400 were present, in TLC-LC-MS the intense signals (most

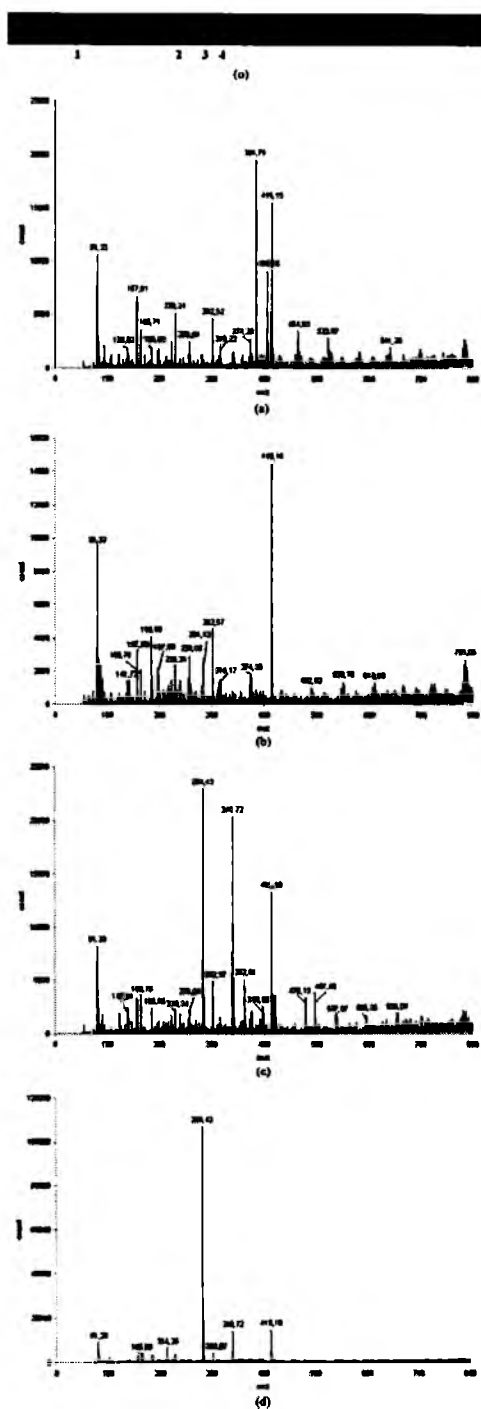


FIGURE 6 (a) The videoscan obtained from the analytical thin layer chromatogram developed for the flavonoids fraction of *Salvia lavandulifolia* at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$, with the bands of interest indicated by numerals (1)–(4), and the mass spectra of (a) band 1, (b) band 2, (c) band 3, and (d) band 4 eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate. (Figure available in color online.)

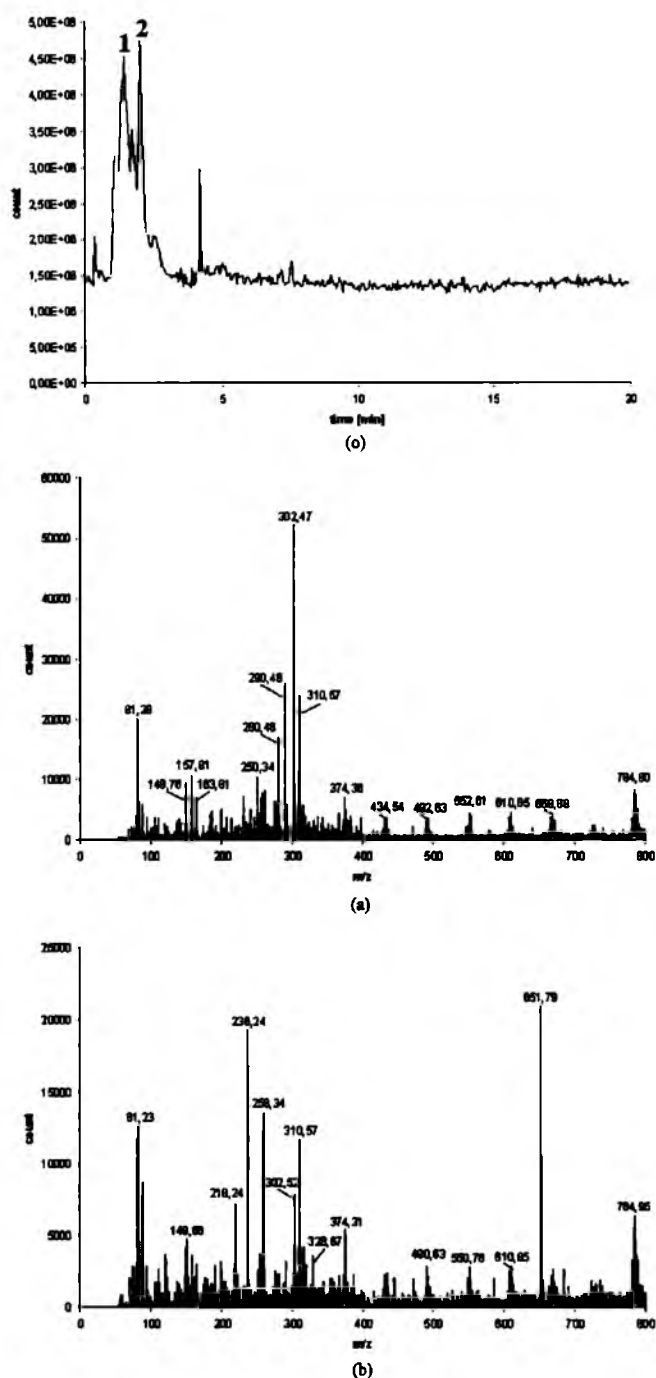


FIGURE 7 (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 1 (Figure 6) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1) and (2), and the mass spectra of (a) peak 1 and (b) peak 2 from the liquid chromatogram.

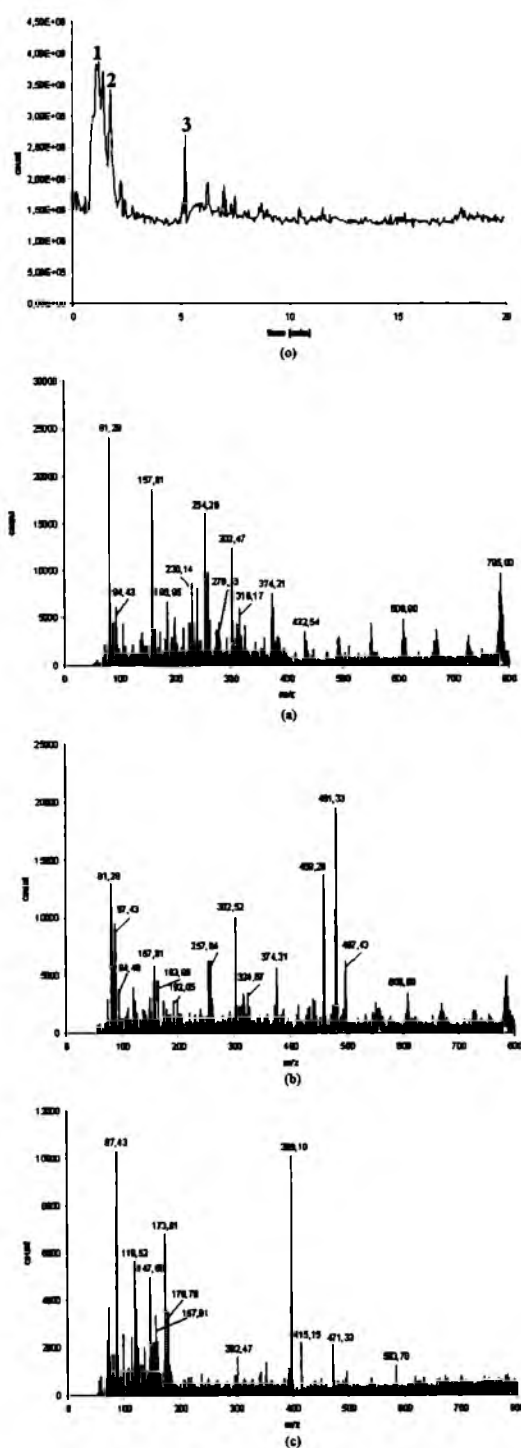


FIGURE 10 (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 4 (Figure 6) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1)–(3), and the mass spectra of (a) peak 1, (b) peak 2, and (c) peak 3 from the liquid chromatogram.

probably characteristic of the heavier flavone and flavonol glycosides) are observed. These higher m/z signals can also be attributed to molecular adducts. For the sake of example, $m/z=651.79$ can be attributed to $[\text{luteolin-7-cellobioside} + \text{Na}]^+$ (Figure 7b), $m/z=471.48$ seems to be valid for $[\text{cinarosid} + \text{Na}]^+$ (Figure 8b), whereas signal at $m/z=481.33$ can represent $[\text{cinaroside} + \text{H} + \text{MeOH}]^+$, or $[\text{lutolin-4'-glucuronide} + \text{H} + \text{H}_2\text{O}]^+$ (Fig. 10b).

Similar to the TLC-MS mode, spectra originating from TLC-LC-MS show the m/z signal at 302. Moreover, most spectra obtained in this study show the signal at m/z equal to 94. This latter signal most probably originates from the $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ fragment split off from apigenin and/or its derivatives (i.e., from genkwanin, hispidulin, and cirsimaritin).

The mass spectrum of band 4 derived from the flavonoid extract in the 1D TLC-MS mode is simple (see Figure 6d), whereas in the 2D TLC-LC-MS mode the same fraction can be divided further, which ultimately results in the three considerably complex mass spectra, as shown in Figure 10a–c. This is a persuasive enough proof that (1) TLC provides a group separation only (whereas coupling of TLC with LC results in better fractionation of a given sample), but also that (2) the two-dimensional TLC-LC mode can be more destructive toward the investigated compounds than the one dimensional TLC mode.

At this point, it certainly has to be added that although the applied ESI MS mode is considered as a mild and non-destructive one, mass spectra originating from both, the TLC-MS, and the TLC-LC-MS mode, are relatively complex and the obtained molecular ion signals characterize with low intensity. One reason of an overall complexity of the obtained mass spectra can be complex composition of the extracted phenolic acid and flavonoid mixture. It cannot, however, be excluded that the extracted phenolic acids and flavonoids under the influence of many external factors (e.g., the light, temperature, and the influence of stationary and mobile phase) can partially undergo structural transformation and/or destruction, which results in a fragmentation which is evident in all the registered mass spectra.

CONCLUSIONS

This study is a consecutive step forward in our demonstrating usefulness of mass spectrometric detection in thin-layer chromatography applied to the fingerprinting of complex mixtures (e.g., those of botanical origin).

It has to be clearly stated that it was not the aim of this study to carry out mass spectrometric identification of the chromatographically separated components of the complex botanical mixtures but just to provide mass spectrometric fingerprints thereof.

We have also pointed to a possibility of constructing the efficient two-dimensional separation and identification liquid chromatographic systems with mass spectrometric detection, based on application of the TLC-MS interface.

Finally, we managed to show that the two-dimensional TLC-LC systems with mass spectrometric detection provided a more abundant fingerprinting material than the one-dimensional TLC ones, which can further be effectively utilized in the chemometrics-based identification approaches.

ACKNOWLEDGMENT

The work of two authors (D.S. and Ł.W.) was partially supported by the PhD scholarship granted to them in 2009 within the framework of the “University as a Partner of the Economy Based on Science” (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union. The work of one author (M.N.) was supported by the post-doctoral grant no. 142062, subsidized by the Ministry of Science of Serbia. The authors wish to express their gratitude to Mrs. Małgorzata Zych from Donau Lab (Polish representative of the firm CAMAG) for kindly lending them the CAMAG TLC-MS interface and in that way enabling this research.

REFERENCES

1. Aranda, M.; Morlock, G. Simultaneous Determination of Riboflavin, Pyridoxine, Nicotinamide, Caffeine and Taurine in Energy Drinks by Planar Chromatography-Multiple Detection with Confirmation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1131*, 253–260.
2. Luftmann, H.; Aranda, M.; Morlock, G. Automated Interface for Hyphenation of Planar Chromatography with Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3772–3776.
3. Aranda, M.; Morlock, G. Using Electrospray-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry to Characterize Organic Compounds Separated on Thin-Layer Chromatography Plates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1297–1303.
4. Aranda, M.; Morlock, G. Application of a Liquid Extraction Based Sealing Surface Sampling Probe for Mass Spectrometric Analysis of Dried Blood Spots and Mouse Whole-Body Thin Tissue Sections. *J. Chromatogr. Sci.* **2007**, *45*, 251–255.
5. Morlock, G.; Jautz, U. Comparison of Two Different Plunger Geometries for HPTLC-MS Coupling Via an Extractor-Based Interface. *J. Planar. Chromatogr.* **2008**, *21*, 367–371.
6. Dytkiewitz, E.; Morlock, G. Analytical Strategy for Rapid Identification and Quantification of Lubricant Additives in Mineral Oil by High-Performance Thin-Layer Chromatography with UV Absorption and Fluorescence Detection Combined with Mass Spectrometry and Infrared Spectroscopy. *J. AOAC Int.* **2008**, *91*, 1237–1243.
7. Sajewicz, M.; Wojtal, Ł.; Hajnos, M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. Low-Temperature TLC-MS of Essential Oils from Five Different Sage (*Salvia*) Species. *J. Planar Chromatogr.-Modern TLC* **2010**, *23*, 270–276.

8. Sajewicz, M.; Wojtal, L.; Natić, M.; Staszek, D.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. TLC-MS versus TLC-LC-MS Fingerprints of Herbal Extracts. Part I. Essential Oils. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2011**, *35*.
9. *Sage – the Genus Salvia*. Kintzios, S. E., Ed.; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 2000.
10. Lu, Y.; Yeap Foo, L. Polyphenolics of *Salvia* – A Review. *Phytochem.* **2002**, *59*, 117–140.
11. Canigual, S.; Iglesias, J.; Hamburger, M.; Hostettmann, K. Phenolic Constituents of *Salvia lavandulifolia* ssp. *lavandulifolia*. *Planta Medica.* **1989**, *55*, 92.
12. Sajewicz, M.; Staszek, D.; Natić, M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. TLC-MS Versus TLC-LC-MS Fingerprints of Herbal Extracts. Part I. Essential Oils. *J. Chromatogr. Sci.*, **2011**, *34*(10–11), 848–863.

TLC–MS Versus TLC–LC–MS Fingerprints of Herbal Extracts. Part III. Application of the Reversed-Phase Liquid Chromatography Systems With C₁₈ Stationary Phase

Mieczysław Sajewicz¹, Dorota Staszek¹, Maja Natic^{1,2}, Monika Waksmundzka-Hajnos³, and Teresa Kowalska^{1,*}

¹Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland, ²Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski Trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia, and ³Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland

Abstract

In the previous paper from this series, we proposed mass spectrometric fingerprinting of complex botanical samples upon the examples of the pharmacologically important phenolic acids and flavonoids selectively extracted from *Salvia lavandulifolia*. In this study, we explore fingerprinting efficiency with a novel two-dimensional analytical system composed of the reversed-phase thin-layer chromatography and the reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (2D RP-TLC–RP-LC–MS). We also compare its efficiency with that of the one-dimensional analytical system (the reversed-phase thin-layer chromatography with mass spectrometric detection; 1D RP-TLC–MS). As our present study is basically focused on the method development, we considered it as justified to carry out our comparison with the phenolic acid extracts selectively derived from the *Salvia lavandulifolia* species, similar as it was done in Part II from this series. Upon the results obtained, it was established that the 1D RP-TLC–MS mode and the 2D RP-TLC–RP-LC–MS mode can be applied to fingerprinting of herbal extracts, and that the 2D RP-TLC–RP-LC mode can provide a more abundant information than that originating from the 1D RP-TLC mode.

Introduction

A mass spectrometric detector can be off-line coupled with the thin-layer chromatographic plate by means of the TLC–MS interface (Camag, Muttenz, Switzerland). In that way, TLC gains an additional analytical dimension which enhances its performance, thus becoming an even more flexible and better performing separation and identification tool than before. With use

of the TLC–MS interface, certain amount of analytical tasks has already been accomplished, basically focused on the separation of the less complicated mixtures of compounds and identification thereof upon their molecular ions. A considerable contribution to this area was done by Morlock et al. [e.g., (1–6)].

In a previous paper (7), the one-dimensional low-temperature thin-layer chromatography with mass spectrometric detection (1D LT TLC – MS) was reported, for the first time applied to the fingerprinting of the complex essential oil samples derived from several sage (*Salvia*) species. In papers (8,9), a novel possibility was introduced of the two-dimensional chromatographic mode making use of the TLC–MS interface and applied to the low-temperature fingerprinting of the essential oil fraction (8) and of the room temperature fingerprinting of the phenolic acid and flavonoid fractions (9) selectively extracted from *Salvia lavandulifolia*. In papers (8,9) the experimental results derived from the one-dimensional analytical system composed of the adsorption thin-layer chromatography coupled with mass spectrometry (1D NP TLC–MS) were presented, and also those for the first time derived from the two-dimensional system composed of the adsorption thin-layer chromatography and the reversed phase high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection (2D NP TLC–RP-LC–MS).

The aim of this study is to investigate the fingerprinting efficiency of the two novel analytical systems, that is, the one-dimensional analytical system composed of the reversed-phase thin-layer chromatography with mass spectrometric detection (1D RP-TLC–MS) and the two-dimensional analytical system composed of the reversed-phase thin-layer chromatography and the reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (2D RP-TLC–RP-LC–MS). These two systems were tested upon the practical example of the phenolic acids fraction selectively extracted from *Salvia lavandulifolia*. Phenolic compounds of the sage origin are widely recognized for their antioxidant, antimicrobial, antiviral, and even

* Author to whom correspondence should be addressed: Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland, email: teresa.kowalska@us.edu.pl.

anticancer properties, hence it seems purposeful to test our novel analytical systems upon these pharmacologically important secondary metabolites of the plant origin (10). Successful fingerprinting of complex samples of botanical origin can prove particularly helpful for identification and quality assurance operations, especially when handling commercial batches of medicinal plants traded in a powdered form.

Experimental

Materials and reagents

Sample of the *Salvia lavandulifolia* species was harvested in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in July, 2009. The plant material comprised all parts of the plant (i.e., roots and the aerial parts) and it was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35°C to 40°C. Then the obtained dry material was stored in the deep-freeze compartment of refrigerator until the commencement of the analysis. Finally, the necessary amounts of the plant material were weighed and powdered in a porcelain mortar. Three replicates of the sage sample were processed in an identical way.

Metenamine was purchased from Pharma Cosmetics (Krakow, Poland), and methanol, toluene, acetone, ethyl acetate, acetic acid, formic acid, and hydrochloric acid used for the experiments were of analytical purity grade and purchased from POCh (Gliwice, Poland). Water was double distilled and de-ionized in the laboratory conditions by means of Elix Advantage model Millipore system (Molsheim, France).

Selective extraction of phenolic acids from the *Salvia* species

Ten grams of the finely powdered plant material was placed in the 250-mL round-bottomed flask on the water bath under the reflux and the sample was three times extracted with the consecutive 50-mL portions of methanol. The methanol extracts were combined and then evaporated under the reduced pressure to dryness. Dry residue was dissolved in 20 mL hot water and then left in the refrigerator for 24 h. Finally, the precipitate was filtered off, and the filtrate was placed in volumetric flask and made up to 100 mL with water.

1D RP-TLC–densitometry

The reversed-phase thin-layer chromatographic separations were performed on the commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of RP-18 F_{254s} (Merck; cat. no. 1.15423). The phenolic acid extracts and the respective standards were spotted onto the thin layer in the 10-μL aliquots, using an AS 30 model autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). For the sake of comparison of the retardation factor (R_f) values and the mass spectrometric fingerprints, we also chromatographed the following standard samples (5 mg/mL solutions in methanol): *p*-coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, rosmarinic acid, protocatechuic acid, *trans*-cinnamic acid, ellagic acid, vanillic acid, syringic acid, and *p*-hydroxybenzoic acid. All standards were purchased from ChromaDex (Irvine, CA).

Development of the planar chromatograms was carried out with the ternary mixture methanol–water–acetic acid, 5:5:0.1 (v/v) at 21 ± 0.5°C for a distance of 15 cm. All planar chromatograms were developed in the sandwich DS chambers

(Chromdes, Lublin, Poland), previously saturated with mobile phase vapor for 15 min.

The developed chromatograms were dried for 3 h at ambient air and eventually evaluated by means of densitometry. Acquisition of the densitograms was carried out with a Desaga CD 60 model densitometer equipped with Windows compatible ProQuant software (Desaga). Concentration profiles of the development lanes for the sage samples were recorded in reflected ultraviolet (UV) light from a deuterium lamp. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm × 0.1 mm. Each TLC analysis was performed in triplicate. Then the developed and scanned chromatographic plates were utilized at the next experimental step, which was either direct analysis of the separated chromatographic bands with use of mass spectrometer (1D RP-TLC–MS), or an indirect analysis of these bands by further separating them with use of high-performance liquid chromatography followed by mass spectrometric detection (2D RP-TLC–RP-LC–MS).

Like in the study presented in papers (8,9), application of TLC–densitometry was an indispensable initial step in each of the procedures introduced in this study. Firstly, it enabled group separation of complex mixtures contained in the investigated samples into several less complex mixtures. Secondly, it allowed localization of the separated chromatographic bands on the plate surface. Consequently, positions of individual chromatographic bands could be marked on the adsorbent surface, indicating the areas for the consecutive elution with use of the TLC–MS interface.

1D RP-TLC–MS

The first chromatographic mode assumed in this study consisted of a direct elution of a given band from the chromatographic plate with use of the TLC–MS interface (Camag), which enabled an introduction of a given band to mass spectrometer. This mode is referred to as the reversed-phase thin-layer chromatography with mass spectrometric detection (1D RP-TLC–MS) and it has been devised to fingerprint the preliminarily fractionated mixture of phenolic acids. Here it needs to be emphasized that all thin-layer chromatograms were performed on the fresh and clean chromatographic plates. However, each plate can absorb humidity and the other volatile compounds (e.g., carbon dioxide) from the environment. Moreover, the residual amounts of the applied mobile phase can also be found on its surface, when eluting a given band even from the dried chromatogram to the mass spectrometer. Thus in order to avoid misinterpretation of the obtained mass spectra, we purposely avoided in our further “Results and Discussion” sections any comments on the signals in the m/z range below 150.

In this study, elution was carried out at ambient temperature either with use of pure methanol, or methanol + acetic acid, 99.5:0.5, v/v (the flow rate equal to 0.2 mL/min). The eluate was directly introduced to the Varian 500-MS model mass spectrometer (Varian, Harbor City, CA) and the samples were analyzed in the ESI mode (full ESI-MS scan, negative ionization, spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 200°C, drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 80 V, needle voltage 5 kV). Varian MS Workstation v. 6.9.1 software was used for data acquisition and processing. Prior to the registration of the spectra, the mass spectrometer was carefully calibrated

according to the procedures prescribed for such calibration by the manufacturer (Varian). Besides, the baseline of the mass spectra was strictly controlled and corrected prior to acquisition of the spectra.

2D RP-TLC-RP-LC-MS

The second chromatographic mode was aimed at mass spectrometric fingerprinting of the phenolic acid extracts derived from the sage species. Owing to the TLC-MS interface, we developed the two-dimensional liquid chromatography system equipped with mass spectrometric detection, off-line coupling the thin-layer chromatographic system with the high-performance liquid chromatograph (TLC-LC) (8,9). In this two-dimensional system, the RP-TLC part provides preliminary group separation of the investigated extract, with individual separated fractions one by one transported with aid of the TLC-MS interface not directly to mass spectrometer, but to the high-performance liquid chromatograph first. Eventually, we used mass

spectrometer as a detector, to obtain the 2D RP-TLC-RP-LC-MS tandem system.

The working conditions of TLC-densitometry and MS employed in this second analytical mode were exactly the same as in the first mode. Liquid chromatographic analysis with mass spectrometric detection (LC-MS) was carried out using an LC-MS System Varian (Varian, Palo Alto, CA) equipped with a Varian ProStar model pump, Varian 100-MS mass spectrometer, and Varian MS Workstation v. 6.9.1 software for data acquisition and processing.

The LC analyses were carried out in the isocratic mode, using a Pursuit X R_s 3-C18 column (50 mm × 2.0 mm i.d.; Varian; cat. no. A6001050C020) and either pure methanol, or methanol-acetic acid, 99.5:0.5 (v/v) as mobile phase at the flow rate of 0.20 mL/min. Mass spectrometric detection and processing of the obtained results were carried out using the same working parameters as those described in the preceding subsection.

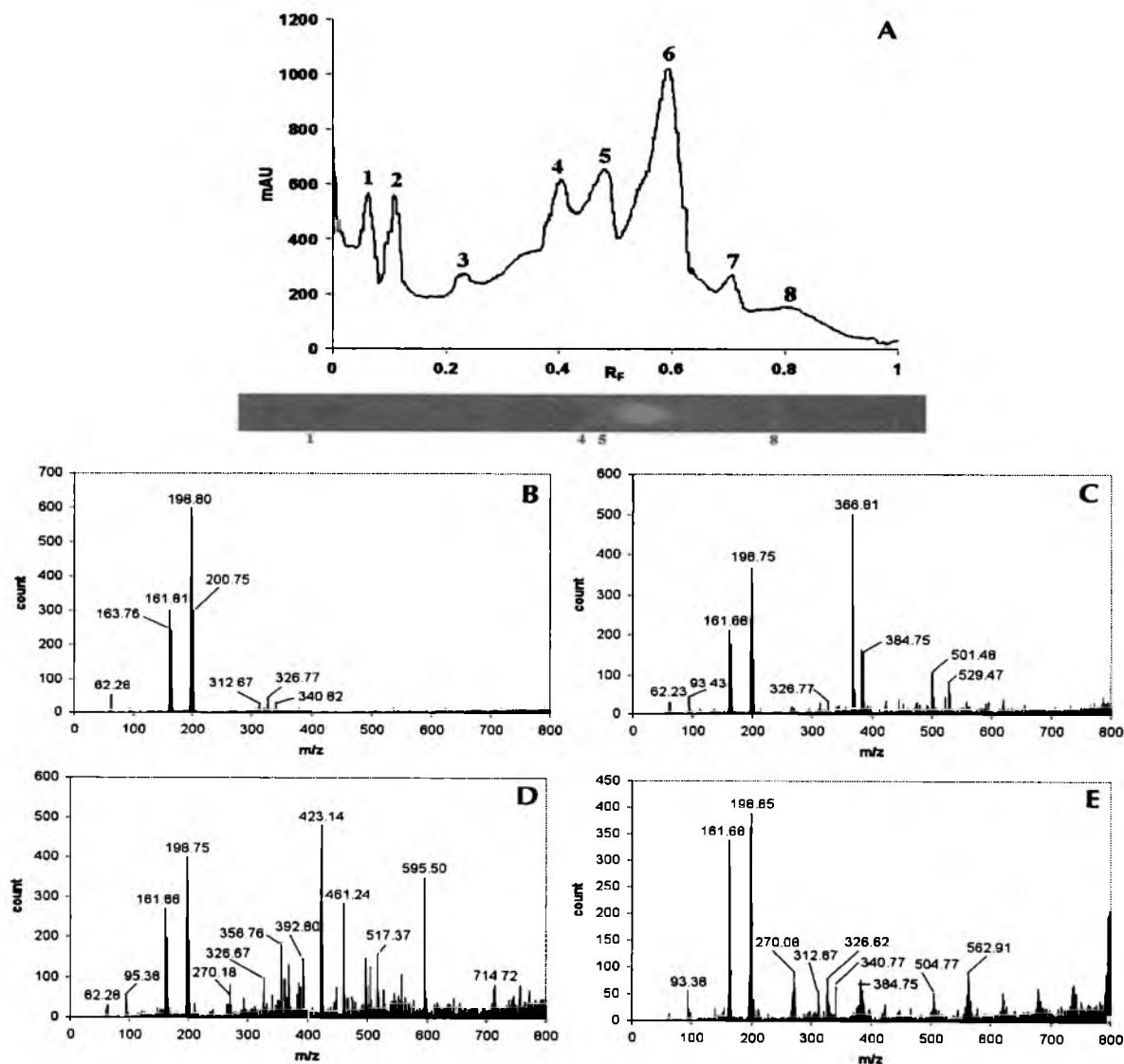


Figure 1. The densitogram and videoscans obtained from the analytical thin layer chromatogram developed at $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for the fraction of phenolic acids selectively extracted from *Salvia lavandulifolia*, with the bands of interest indicated by numerals 1, 4, 5, and 8 (A), and the mass spectra of band 1 (B), band 4 (C), band 5 (D), and band 8 (E) eluted from the chromatographic plate with use of the TLC-MS interface.

Results

1D RP-TLC-MS

Separation of the phenolic acids extract derived from *Salvia lavandulifolia* was carried out with use of the reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) on the C_{18} stationary phase and with the aqueous eluent. Videoscanner of the chromatogram showing the developed phenolic acids was recorded at 366 nm and it is shown in Figure 1A. In the same Figure 1A, the densitogram recorded from the chromatographic plate is presented, with the eight bands (1–8) indicated on it.

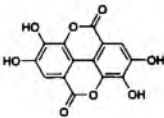
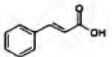
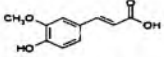
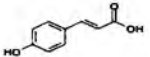

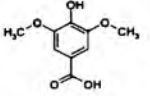
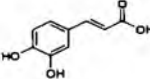

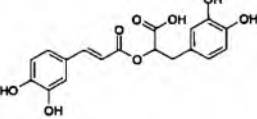
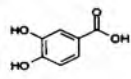
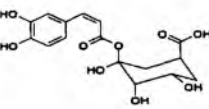
In an attempt to ascribe the separated chromatographic bands to individual phenolic acids, it was necessary to use the retardation parameter (R_f) values of the employed standard compounds (see Table I). From our experiment it can be assumed that the majority of the applied standards were not detected in the investigated *Salvia lavandulifolia* extract on the thin-layer chromatographic C_{18} plate. Further, it can be assumed that band 4 contains caffeic acid (as convincingly proved by its intensely blue fluorescence both with the standard and the extract sample, when the chromatogram was irradiated with the 366 nm light), band 6 contains rosmarinic acid, and band 7 contains chlorogenic acid (see Table I). None of the employed standards could be ascribed to bands 1–3, 5, and 8. The sequence of the identified phenolic acids on the considered chromatogram remains in rational agreement with the chemical structure of the detected compounds. Thus, caffeic acid identified in band 4 (with its two hydroxyl groups in a vicinal position and therefore apt to form intramolecular H-bonds), certainly has greater affinity to the non-polar stationary phase than rosmarinic acid identified in band 6 (which contains five hydroxyl groups in its molecule and hence, shows less affinity to this stationary phase than caffeic acid). The lowest affinity to C_{18} is observed with chlorogenic acid (band 7), due to the six hydroxyl groups per one acid molecule.

The mass spectra shown in this study refer to the selected thin-layer chromatographic bands only (and not to all bands separated and denoted in Figure 1A as bands 1–8), as our methodical goal was to demonstrate the selected examples of a direct mass spectrometric evaluation (with a possibility of the future fingerprinting kept in mind) of the thin-layer chromatograms of the complex natural mixtures of botanical origin, and also to compare these preliminary fingerprinting result of the 1D RP-TLC-MS mode with the 2D RP-TLC-RP-LC-MS one. Repeated acqui-

sition of the mass spectra from the different thin-layer chromatograms performed for one and the same phenolic acids extract was carried out, in order to verify the repeatability of the assumed approach. Based on visual inspection and comparison of the obtained mass spectra, very good repeatability was confirmed in this sense that the analogous signals were present in the compared mass spectra, and also the general profiles (or envelopes) were very similar.

Thus, in Figure 1B–1E, mass spectra are presented valid for bands 1, 4, 5 and 8, respectively (as denoted on the densitogram

Table I. Selected Phenolic Acids Traced in the *Salvia lavandulifolia* Extract*

Standard	Structural formula	Molecular weight	R_f	Peak no.
Ellagic acid		302.20	0.15 (tailing)	–
<i>trans</i> -Cinnamic acid		148.17	0.19	–
Ferulic acid		194.18	0.42	–
<i>p</i> -Coumaric acid		164.16	0.44	–
Vanillic acid		168.15	0.52	–
Syringic acid		198.17	0.53	–
Caffeic acid		180.16	0.54	4
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid		138.12	0.55	–
Rosmarinic acid		360.31	0.58	6
Protocatechuic acid		154.12	0.68	–
Chlorogenic acid		354.31	0.71 (tailing)	7

* Their respective structural formulas and molecular weights, the retardation factor (R_f) values for the selected standard compounds, and a possible occurrence thereof in chromatographic peaks indicated in Figure 2.

and videoscanner), eluted with use of the TLC-MS interface and the methanol-acetic acid eluent. Prior to a more detailed discussion of these results, let us make the following general statement. All three phenolic acids identified by means of TLC in the *Salvia lavandulifolia* extract (i.e., caffeic acid, rosmarinic acid, and chlorogenic acid) are made of the caffeic acid building block, as it can easily be seen from a comparison of molecular structures given in Table I. In all mass spectra given in Figure 1B–1E, characteristic signal at m/z 198 can be observed and it seems largely

probable that this intense signal is closely related to the adduct of caffeic acid with water. Another characteristic feature of the recorded mass spectra (see Figure 1D–1E) is the signals which appear at the values higher than m/z 400.

2D RP-TLC-RP-LC-MS

Similarity between the mass spectra originating from the TLC-MS and the TLC-LC-MS mode is evident and in a sense expected. For all RP-TLC-RP-LC-MS spectra, the presence of a

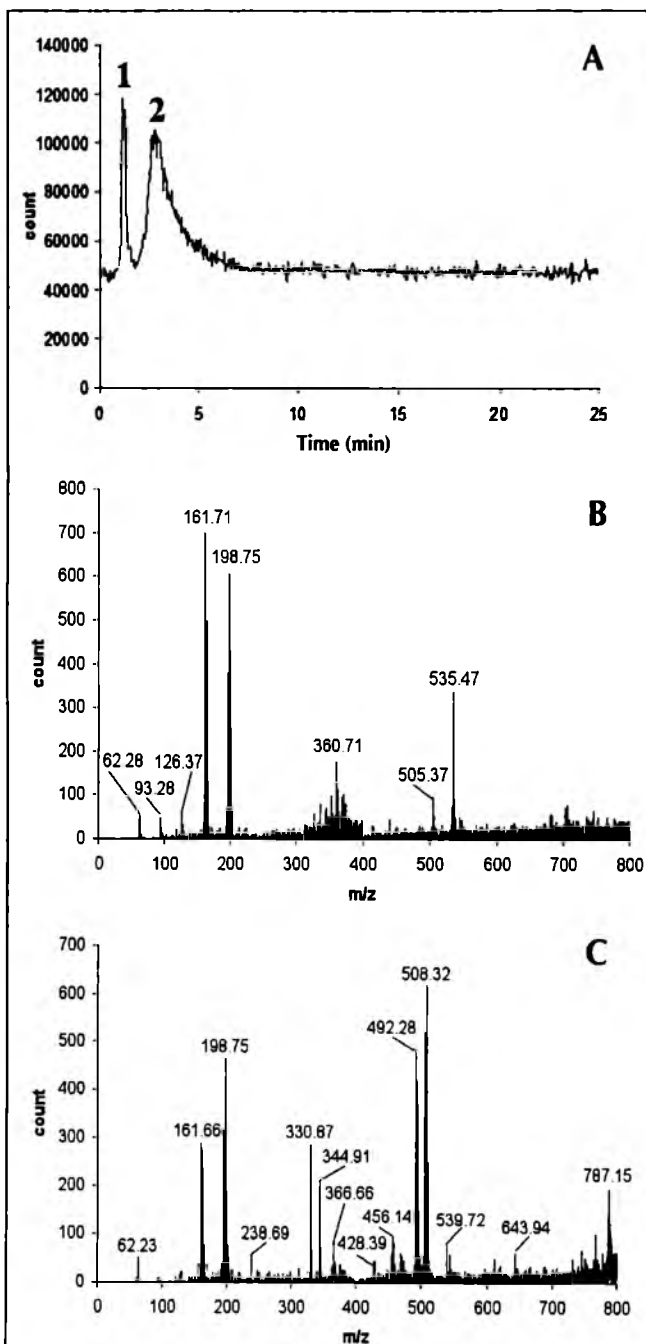


Figure 2. Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 1 (Figure 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals 1 and 2 (A), and the mass spectra of band 1 (A) and band 2 (B) from the liquid chromatogram.

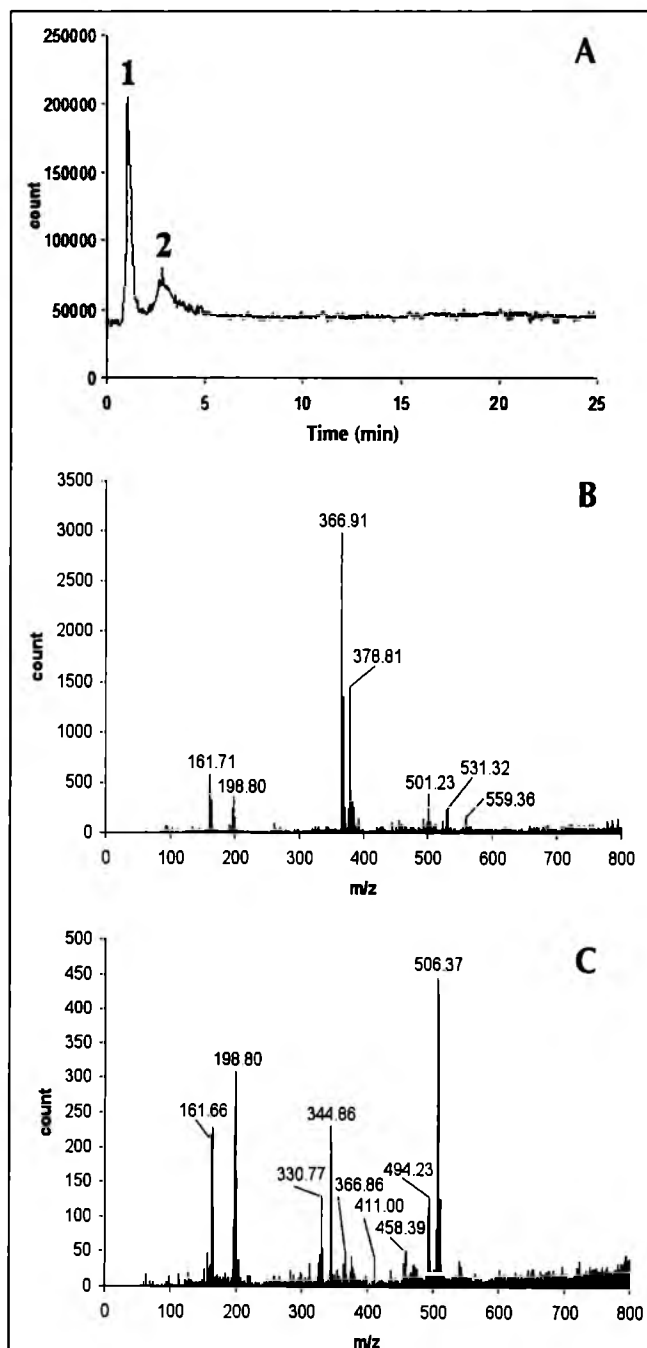


Figure 3. Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 4 (Figure 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals 1 and 2 (A), and the mass spectra of band 1 (A) and band 2 (B) from the liquid chromatogram.

large number of signals with the relatively high m/z values seems characteristic (see Figures 2–5). These signals can originate from the caffeic acid-derived trimers. For example, the signal at m/z 535.52, present in the spectrum given in Figure 2B, can originate from the (sagecoumarin – H)[–] anion and the signal at m/z 539.77, present in Figure 2C, can be attributed to the (yunnaneic acid D – H)[–] anion. In Figure 2B, a very intense signal at m/z 360 can be seen, which can originate from the caffeic acid dimers, or from rosmarinic acid (and more exactly, from the rosmarinic acid derivatives, e.g., its glucosides).

Discussion

The hydrophobic surface of the C₁₈ thin layer employed in this study has proved better suited for the analysis of phenolic acids than the highly active silica gel adsorbent, employed for the same purpose in our previous study (9) and evidently able to induce structural transformation of these acids. As a result, even after a short exposure of the silica-gel chromatograms to ambient air, the separated bands have been turning yellowish-brown, which made a comparison between these bands and those of the standards hardly possible. In our present study, the C₁₈ layer enabled an easy classical usage of the external standards to identification of the bands separated by means of TLC.

At the same time, we are aware of the fact that an agreement between the retardation factor (R_F) values of the standard compounds and the respective bands on the chromatogram of the *Salvia lavandulifolia* extract cannot be regarded as an undeniable identification proof, although it can serve as a strong suggestion, especially when combined with the observations summarized below.

Right from the beginning of our experiment, we realized that most of the phenolic acid standards (i.e., ellagic, ferulic, *p*-coumaric, vanillic, syringic, caffeic, *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, and chlorogenic acid) applied in this study have never before been identified in *Salvia lavandulifolia*, except for rosmarinic acid (11). Our present results largely confirmed the previous findings, except for caffeic acid and chlorogenic acid. What is perhaps most important, from the review on polyphenolics identified in the *Salvia* genus (12) it comes out that with all *Lamiaceae*, the presence of chlorogenic acid is surprisingly uncommon and prior to our own research, it has not been reported in *Salvia lavandulifolia* (which seems a rather valuable contribution of this study to identification of its phenolic acids composition).

Chlorogenic acid on the C₁₈ plate was tailing (maybe due to the hydrolysis of this glycoside under the influence of acetic acid contained in mobile phase, and partial release of the caffeic acid aglycone and the sugar moiety). Another (or maybe complementary) reason of this tailing could be the fact that the molecule of chlorogenic acid contains five hydroxyl (–OH) groups. Three of them belong to the sugar moiety in the chair conformation and appear, respectively, in the axial and equatorial position, thus unable to build intramolecular H-bonds. They can, however, interact through the intermolecular H-bonds with residual non-bonded silanols (Si–OH) of C₁₈, in that way

contributing to the observed “smearing” effect.

Now let us refer to the mass spectrometric results. As it comes out from the literature (12), trimers derived from caffeic acid constitute the largest group of the *Salvia* genus metabolites. They include such compounds, as lithospermic acid (m.w. 538), sagecoumarin (m.w. 536), salvianolic acids H, I, J, and K, with their respective molecular weights equal to 531, 531, 526, and 555, and yunnaneic acids C, D, E, and F, with their respective molecular weights equal to 538, 540, 572, and 597. Thus, the

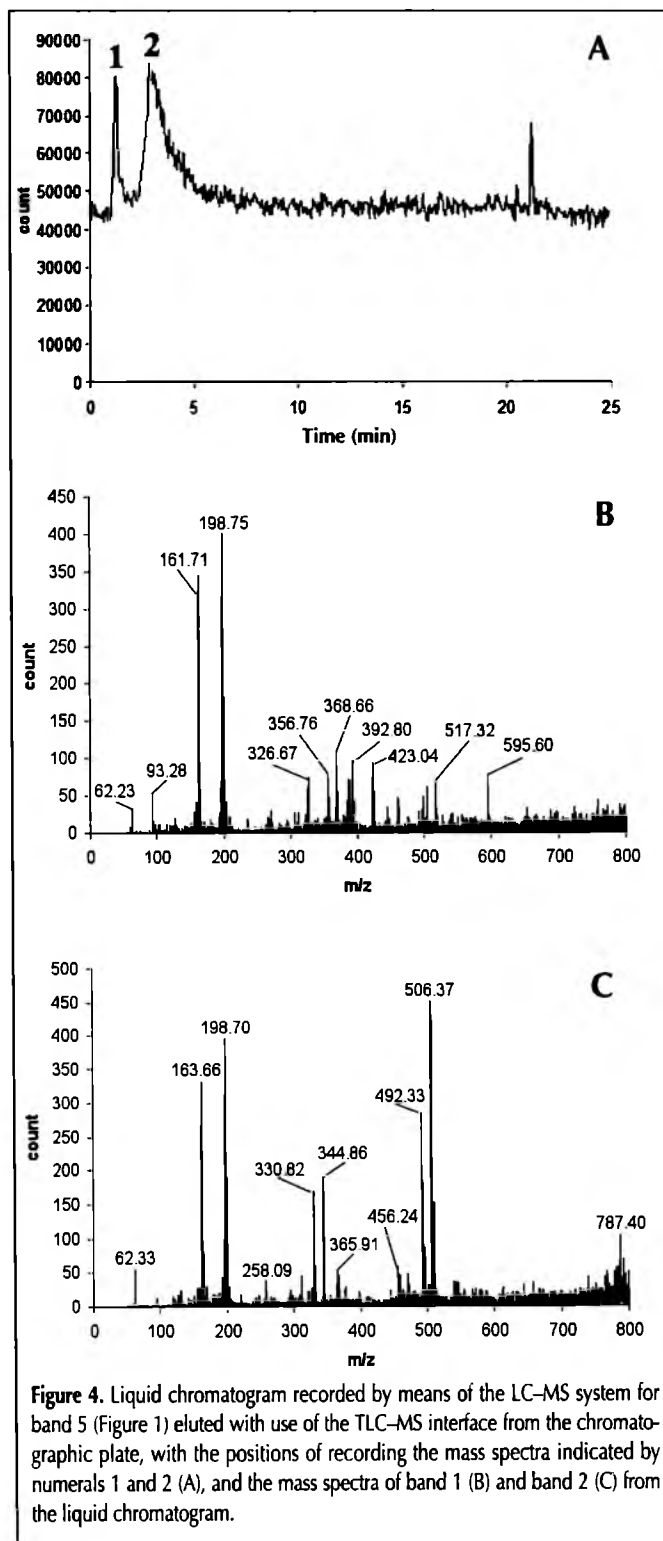


Figure 4. Liquid chromatogram recorded by means of the LC–MS system for band 5 (Figure 1) eluted with use of the TLC–MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals 1 and 2 (A), and the mass spectra of band 1 (B) and band 2 (C) from the liquid chromatogram.

mass spectrometric signals which appear in Figure 1C–1E at the values higher than m/z 400 could probably be ascribed to certain phenolic acid trimer(s).

Finally, it can be concluded that the results obtained with use of the two analytical techniques discussed in this study (i.e., TLC–MS and TLC–LC–MS) are important for the future fingerprinting of any given herbal material. Evident complexity of the mass spectrometric fingerprints makes their direct visual inspection and comparison rather difficult and hence, an imme-

diate necessity arises to develop an adequate chemometric approach that might enable a more accurate utilization of the rich information contained therein.

Conclusion

The hydrophobic C_{18} thin layer has proved a right adsorbent for the group separation of the phenolic acids fraction selectively extracted from the *Salvia lavandulifolia* sample and for the classical usage of the external standards.

Upon the obtained TLC results, it can be deduced that the *Salvia lavandulifolia* extract might probably contain chlorogenic acid never before reported to occur in this particular sage species.

Mass spectrometric fingerprinting of the phenolic acids extract preliminarily separated with use of both, the 1D RP-TLC and the 2D RP-TLC–RP-LC mode is possible and it furnishes an abundant data set, which can prove very helpful in chemotaxonomy and for the plant identification purposes.

Due to considerable complexity of the mass spectrometric fingerprints, a chemometric approach has to be developed, able to facilitate their rapid and non-biased usage.

Attribution of certain mass spectrometric signals to the selected constituents of the investigated plant extract can be considered as tentative and provisional only, as no rigid identification protocol has been followed in this study.

Acknowledgement

The work of two authors (D.S. and Ł.W.) was partially supported by the PhD scholarship granted to them in 2009 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union. The work of one author (M.N.) was supported by the post-doctoral grant no. 142062, subsidized by the Ministry of Science of Serbia. The authors wish to express their gratitude to Mrs. Małgorzata Zych from Donau Lab (Polish representative of the firm CAMAG) for kindly lending them the CAMAG TLC–MS interface and in that way enabling this research.

References

1. M. Aranda and G. Morlock. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1131**: 253–260 (2006).
2. H. Luftmann, M. Aranda, and G. Morlock. Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 3772–3776 (2007).
3. M. Aranda and G. Morlock. Using electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to characterize

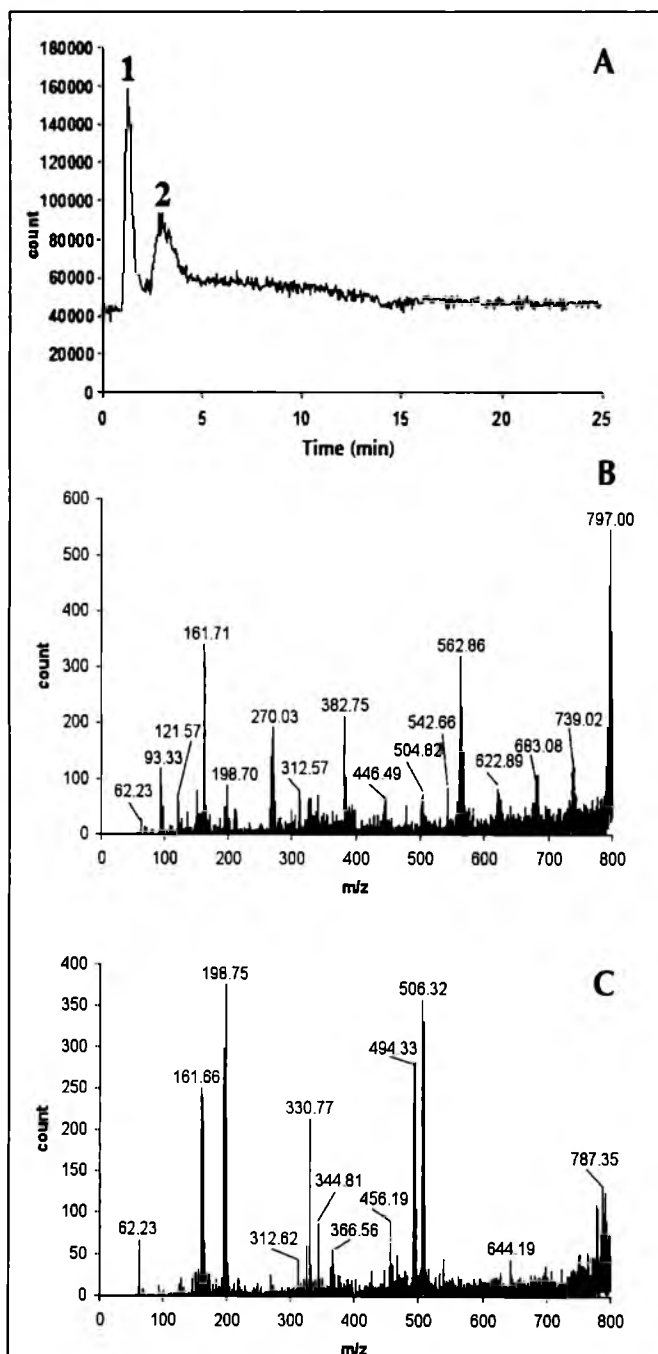


Figure 5. Liquid chromatogram recorded by means of the LC–MS system for band 8 (Figure 1) eluted with use of the TLC–MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals 1 and 2 (A), and the mass spectra of band 1 (B) and band 2 (C) from the liquid chromatogram.

- organic compounds separated on thin-layer chromatography plates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 1297–1303 (2007).
4. M. Aranda and G. Morlock. Application of a liquid extraction based sealing surface sampling probe for mass spectrometric analysis of dried blood spots and mouse whole-body thin tissue sections. *J. Chromatogr. Sci.* **45**: 251–255 (2007).
 5. G. Morlock and U. Jautz. Comparison of two different plunger geometries for HPTLC-MS coupling via an extractor-based interface. *J. Planar. Chromatogr.* **21**: 367–371 (2008).
 6. E. Dytkiewicz and G. Morlock. Analytical strategy for rapid identification and quantification of lubricant additives in mineral oil by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption and fluorescence detection combined with mass spectrometry and infrared spectroscopy. *J. AOAC Int.* **91**: 1237–1243 (2008).
 7. M. Sajewicz, Ł. Wojtal, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska. Low-temperature TLC-MS of essential oils from five different sage (*Salvia*) species. *J. Planar Chromatogr.-Modern TLC.* **23**: 270–276 (2010).
 8. M. Sajewicz, Ł. Wojtal, M. Natic, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska. TLC-MS versus TLC-LC-MS Fingerprints of herbal extracts. Part I. Essential oils. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011 (in press)
 9. M. Sajewicz, D. Staszek, M. Natic, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska. TLC-MS versus TLC-LC-MS Fingerprints of herbal extracts. Part II. Phenolic acids and flavonoids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011 (in press)
 10. *Sage—the Genus Salvia*. S.E. Kintzios, Ed. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000.
 11. S. Canigüeral, J. Iglesias, M. Hamburger, and K. Hostettmann. Phenolic constituents of *Salvia lavandulifolia* ssp. *lavandulifolia*. *Planta Medica.* **55**: 92 (1989).
 12. Y. Lu and L. Yeap Foo. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochem.* **59**: 117–140 (2002).

Manuscript received November 2, 2010;
revision received January 5, 2011.

Development of Chromatographic and Free Radical Scavenging Activity Fingerprints by Thin-layer Chromatography for Selected *Salvia* Species

Łukasz Cieśla,^a Dorota Staszek,^b Michał Hajnos,^c Teresa Kowalska^b and Monika Waksmundzka-Hajnos^{a*}

ABSTRACT:

Introduction – Plant-derived free radical scavengers have become the subject of intensive scientific interest. Recently, the concept of coupling chromatographic fingerprints with biological fingerprinting analysis has gained much attention for the quality control of plant extracts. However, identification of free radical scavenging activity of each single compound in a complex mixture is a difficult task. Thin-layer chromatography with post-chromatographic derivatisation with the methanol solution of DPPH can be a valuable tool in such analyses.

Objective – Development of chromatographic and free radical scavenging fingerprints of nineteen *Salvia* species grown and cultivated in Poland.

Methodology – Chromatography was performed on the silica gel layers with use of two eluents, one for the resolution of the less polar compounds, and the other one for the resolution of the medium and highly polar ones. The plates were sprayed with the vanillin–sulfuric acid reagent to produce chemical fingerprints, and with DPPH solution to generate free radical scavenging fingerprints.

Results – With four *Salvia* species, it was revealed that their strong free radical scavenging properties are not only due to the presence of polar flavonoids and phenolic acids, but also due to the presence of several free radical scavengers in the less polar fraction. Because of the similarities in both the chromatographic and the free radical scavenging fingerprints, *S. triloba* can be introduced as a possible equivalent of the pharmacopoeial species, *S. officinalis*.

Conclusion – Fingerprints developed in the experiments proved useful for the analysis of complex extracts of the different *Salvia* species. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Salvia* spp.; fingerprint; free radical scavengers; thin-layer chromatography; polyphenolics

Introduction

Salvia, the largest genus of the *Lamiaceae* family, has been credited with a long list of medical uses, including: spasmolytic, anti-septic, astringent, antibacterial and antioxidant activities (Kivrak *et al.*, 2009). Recently, an attention has been directed toward the water soluble antioxidants and free radical scavengers of the *Salvia* genus, which have proved as protective against cardiovascular diseases and certain forms of cancer (Rice-Evans *et al.*, 1996; Lu and Foo, 2002). Plant phenolics (such, as flavonoids, phenylpropanoids and phenolic acids) can act as free radical scavengers, or as contributing agents to the mechanisms of anticarcinogenic or cardioprotective action (Rice-Evans *et al.*, 1996; Matkowski and Piotrowska, 2006). The *Salvia* genus is a rich source of polyphenols, with over 160 of them having been identified so far (Lu and Foo, 2002). Because the reactive oxygen species (ROS) were found as responsible for numerous human diseases (e.g. atherosclerosis, Alzheimer's disease, inflammation, asthma, rheumatoid arthritis, etc.), antioxidants and free radical scavengers are currently the subject of an intensive research interest (Niederländer *et al.*, 2008). Usually simple spectrophotometric techniques have been applied to determination of the total antioxidant activity of complex mixtures (such as, e.g., the plant extracts; Tepe *et al.*,

2004; Orhan *et al.*, 2007; Tepe, 2008). However, determination of the antioxidant potential and antiradical activity for each individual compound contained in a complex mixture is a very difficult task. Several techniques that combine HPLC with post-column chemical detection have been proposed to screen plant extracts for their antioxidant contents (Neungchamnon *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2008; Niederländer *et al.*, 2008). A good separation power of the HPLC methods combined with fast post-column derivatisation is the greatest asset of such approaches. However, several of those have never been applied

* Correspondence to: M. Waksmundzka-Hajnos, Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland. E-mail: monika.hajnos@am.lublin.pl

^a Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland

^b Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

^c Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, 1 Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

since being reported, apparently due to experimental problems (Niederländer *et al.*, 2008). Another shortcoming of the on-line HPLC techniques is their limitation to one sample per run, which greatly extends the analysis time.

Therefore, recently, a need to develop new methods for screening a free radical scavenging potential of individual compounds contained in complex mixtures is steadily growing. Thin-layer chromatography (TLC) is often the method of choice for the screening of plant extracts for the presence of biologically active compounds. An advantage of TLC is the speed of method development, high sample throughput and flexibility. It is particularly well suited for direct biological detection, since the separation result is immobilised prior to the detection and, moreover, the open solid bed layer allows direct access to the sample (Poole, 2003). The number of selective visualising reagents that can be used for the different target compounds is also large. One more advantage is that the normal-phase TLC systems used for identification of polar bioactive compounds often outperform the reversed-phase systems, where polar compounds tend to be poorly retained (Poole, 2003). TLC has been utilised for isolation and/or identification of the free radical scavengers and antioxidants in the plant extracts and foods. In that case, the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was used as a derivatising agent (Bhattarai *et al.*, 2008; Pozharitskaya *et al.*, 2008). However, with most published methods, the real potential of the TLC-antioxidant screening technique has remained not yet fully exploited or even explored (e.g. certain compounds with the known free radical scavenging properties are left unresolved). Therefore, it is an urgent task now to develop a TLC method that allows screening of the free radical scavenging potential of all the compounds present in a complex natural sample.

Usually, plant extracts are complex mixtures that contain hundreds of compounds, although some of them only exhibit biological activity. For the quality control of herbal medicines, it is important to derive as much information from a sample as possible (Fan *et al.*, 2006). The chromatographic profile (fingerprint) and the most active constituents are usually taken into consideration for an assay of authenticity and quality of herbal medicines (Liang *et al.*, 2004). Recently, the concept of developing the activity and biological fingerprints has been proposed to adequately reveal the quality characteristics of medicinal plants and herbal preparations (Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). A potency fingerprint that can quantitatively analyse the antioxidant activity of individual constituent and provide the total antioxidant activities of the samples has recently been proposed (Chang *et al.*, 2009). The method involved the use of high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet and pyrogallol–luminol chemiluminescence detection.

Because of the wide spectrum of its biological activity, the *Salvia* genus has been widely investigated. Several studies were performed to assess the total antioxidant activity of selected *Salvia* species (Tepe *et al.*, 2004; Orhan *et al.*, 2007; Kelen and Tepe, 2008; Kivrak *et al.*, 2009). An on-line HPLC chemiluminescence technique was proposed for detection of the free radical scavengers in the preparation containing *Salvia miltiorizsa* (Chang *et al.*, 2008). Moreover, several chromatographic techniques were proposed to construct fingerprints of different *Salvia* species (Gu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008; Rzepa *et al.*, 2009).

In this study, the chemical and free radical scavenging TLC fingerprints were used for the purposes of the quality control of 19 *Salvia* species. Fractions of differentiated polarity were inves-

tigated for the presence of substances exhibiting free radical scavenging potential. The main advantages of the presented technique are its simplicity, flexibility, speed and the possibility to present the results in form of a picture that can easily be processed with an image-processing program. To the best of our knowledge, chemical thin-layer chromatographic and the free radical scavenging fingerprints have not yet been reported for the quality control of herbal medicines.

Experimental

Apparatus and reagents

The following standards: gallic acid (Ga), hyperoside (H) and rutin (Ru) were obtained from Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the remaining ones, i.e. caffeic acid (C), chlorogenic acid (Cl) and rosmarinic acid (R), were purchased from ChromaDex (Santa Ana, USA). *n*-Hexane, methanol, toluene, ethyl acetate and formic acid used as the extracting solvents or the mobile phase components were manufactured by Merck (KGaA, Darmstadt, Germany). Sulfuric acid was obtained from Polish Reagents (Gliwice, Poland). All solvents were of the analytical purity grade. Vanillin and DPPH were purchased from Aldrich.

TLC was performed on 10 cm × 20 cm glass-backed silica gel TLC 60F₂₅₄ plates (lot no. 0B535150), purchased from Merck. Solutions of all test substances and plant extracts were applied to the chromatographic plates band-wise by means of a Camag automatic TLC sampler (Camag, Muttenz, Switzerland) and developed in the horizontal DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland). Location of the bands was carried out after derivatisation in visible light. Chromatograms were documented using a Camag TLC Reprostar 3 device with Videostore computer program, and scanned with the Camag TLC Scanner 3 densitometer equipped with the CATS 4 computer program. The obtained videoscans were processed using the Image J image-processing program (available on-line, and elaborated by the National Institutes of Health, USA).

Standard substance solutions and plant extracts

All reference substances were dissolved in methanol to prepare the 1.0 mg/mL solutions. Extracts from 19 dried *Salvia* species were obtained from the plants collected in the Pharmacognosy Garden (Lublin, Poland) in the course of the vegetation periods of 2007 and 2008. The list of the investigated species is given in Table 1. Botanical material was authenticated and voucher specimens were deposited at the Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin. The fresh material was oven-dried at a temperature not exceeding 40°C for 40 h. The dried plant material remained frozen until the time of extraction and chromatographic analysis. Accelerated solvent extraction (ASE) was performed with the ASE extractor (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). First, the samples were extracted with *n*-hexane to get rid of chlorophylls, then extraction was performed with use of methanol. The optimised extraction conditions were: temperature, 40°C (*n*-hexane) and 100°C (methanol); pressure, 68 atm (*n*-hexane) and 65 atm (methanol); initial heating time, 10 min (*n*-hexane) and 2 min (methanol); heating time after introduction of solvent, 5 min (with both solvents); static extraction time, 5 min (with both solvents); solvent volume, 40 mL (with both solvents); number of cycles, 2 (with both solvents). A detailed description of the extraction procedure of the plant material can be found in our earlier work (Cieřla *et al.*, 2010).

Thin-layer chromatography

Standard and sample solutions were applied to the 10 × 20 cm silica gel TLC plates band-wise (band length 12 mm, 1 µL/s delivery speed, track distance 1 mm, distance from the left edge 10 mm and from the low edge 10 mm). The 5 µL aliquots of standard solutions and the 10 µL aliquots of the investigated *Salvia* samples were applied onto the plates. The plates were dried in a hood for 10 min before development. The development

Table 1. The investigated *Salvia* species

Sample no.	Species
1	<i>Salvia officinalis</i>
2	<i>Salvia triloba</i>
3	<i>Salvia canariensis</i>
4	<i>Salvia lavandulifolia</i>
5	<i>Salvia farskohlei</i>
6	<i>Salvia sclarea</i>
7	<i>Salvia verticillata</i>
8	<i>Salvia pratensis</i>
9	<i>Salvia tesquicola</i>
10	<i>Salvia deserta</i>
11	<i>Salvia hians</i>
12	<i>Salvia cadmica</i>
13	<i>Salvia glutinosa</i>
14	<i>Salvia atropatana</i>
15	<i>Salvia azurea</i>
16	<i>Salvia staminea</i>
17	<i>Salvia jurisicii</i>
18	<i>Salvia amplexicaulis</i>
19	<i>Salvia nemorosa</i>

was carried out in the horizontal DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland) at ambient temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$. For the less polar constituents, as mobile phase we used solvent system I, composed of toluene–ethyl acetate–formic acid, 60:40:1 (v/v/v). For the medium and highly polar substances, solvent system II was applied composed of ethyl acetate–water–formic acid–acetic acid, 100:26:11:11 (v/v/v/v). Pre-saturation of the chromatographic chamber was performed only in the case of solvent system II and it lasted for 15 min. The plates were developed to the distance of 90 mm. Then the plates were dried at room temperature for 15 min, prior to derivatisation.

Derivatisation and DPPH assay

The vanillin–sulfuric acid reagent was prepared by mixing 1 g vanillin with 20% sulfuric acid in methanol. The plates were sprayed with this reagent using the automatic spraying device (Merck) and then heated for 5 min at 105°C . Plate images were collected in visible light. They were also scanned with densitometer at the wavelengths $\lambda = 254$ and 366 nm, with the slit parameters 1×0.1 mm. Separated bands in the analysed samples were identified by matching their R_f values and UV–vis spectra, respectively, with those obtained for the standards.

In order to check free radical scavenging properties of the investigated samples, the chromatographic plates were sprayed with an 0.2% DPPH reagent in methanol and left at ambient temperature for 30 min. Yellow spots obtained as a result of bleaching the purple color of the DPPH reagent were interpreted as a positive free radical scavenging activity (Kivrak *et al.*, 2009). Images of the plates were processed with Image J processing program, and the substances with free radical scavenging activity were identified as negative peaks.

Method validation

The method was validated for its specificity, precision (repeatability and intermediate precision), stability and robustness according to the recognised AOAC guidelines for the qualitative TLC procedures (Reich *et al.*, 2008).

Precision was expressed as precision of the positions (the R_f values) of the separated zones. Checking repeatability, three individual portions of a given *Salvia* sample were prepared according to the earlier described method. Three aliquots of each sample were applied onto the three plates. The plates were subsequently chromatographed, using the same

chamber but each time a fresh portion of mobile phase. The intermediate precision test was performed in an analogous way, i.e. a number of the selected *Salvia* species were chromatographed on the three different days, one sample per one species. Variability of the R_f values for several 'marker zones' across each plate, and variability of the average R_f values of those markers on the three plates was evaluated.

Stability on the plate was determined by comparing fingerprints obtained for the samples applied to the plates 1, 2, and 3 h prior to the development with the fingerprint obtained for the sample applied just before the development. The stability of the sample in solution was determined by multiple measurements of one sample solution at different storage times, i.e. after 0, 6, 24 and 48 h. In order to check sample stability during the chromatographic process, a simple 2D test was performed, i.e. selected *Salvia* samples were chromatographed with the same eluent in both directions. To this effect, solvent systems I and II were checked.

The influence of deliberate, small changes in the chromatographic parameters, e.g. mobile phase composition, heating temperature and drying time, on the final results was also checked. A more detailed description of the validation procedures was given in our earlier work (Cieřla *et al.*, 2010).

Results and Discussion

The first part of the experiment was focused on the development of chromatographic fingerprints, based partially on the results obtained in our earlier work (Cieřla *et al.*, 2010). As the methanol extracts of the investigated *Salvia* species are very complex, two different chromatographic systems were applied, focusing on resolution of the low, medium and high polarity compounds. For the less polar fraction, solvent system I was applied, and for the medium and highly polar fractions, solvent system II was used. Different visualising agents were tested and for both the less polar and the medium and highly polar fractions, and the best results were obtained with the vanillin–sulfuric acid reagent. Its usage proved particularly advantageous with the medium and highly polar fraction, allowing a vast number of chromatographic bands to appear in the respective fingerprints. In that way, the presence of rosmarinic, gallic and caffeic acid was confirmed in the analysed extracts (Fig. 1). For almost all sage species (with the exception of *S. deserta*), the bands present between the application point ($R_f = 0$) and the band at $R_f = 0.33$ are fully analogous and they can be considered as characteristic of the *Salvia* spp. Two other bands at the R_f values of 0.63 and 0.67 also appear in all chemical profiles. Chromatographic patterns characteristic of the individual sage species appear in the lower R_f range of the less polar chemical fingerprints and they can be applied for differentiation of these species.

Application of solvent system II (with relatively high elution strength) resulted in the separation of medium and highly polar constituents, mainly the more polar phenolic acids, and the different flavonoid aglycones and their glycosides (Fig. 2). Chromatographic fingerprints obtained with aid of the visualising reagent were quite similar for the majority of the investigated species. As a characteristic feature, we considered the presence of several dark zones in the lower R_f range, which can be attributed to very polar glycosides. At $R_f = 0.06$, an intensive dark band appeared in the respective chromatograms of *S. officinalis*, *S. farskohlei*, *S. glutinosa* and *S. jurisicii*. As can be seen from Fig. 2, chromatograms of these species are characterised by a lower number of bands just above the aforementioned zone than the remaining analysed species. It could happen that these dark bands originate from the products of partial deglycosilation of polyphenolics in the course of the plant drying process. Also the four bands at the R_f values equal to 0.10, 0.31, 0.76, and 0.80,

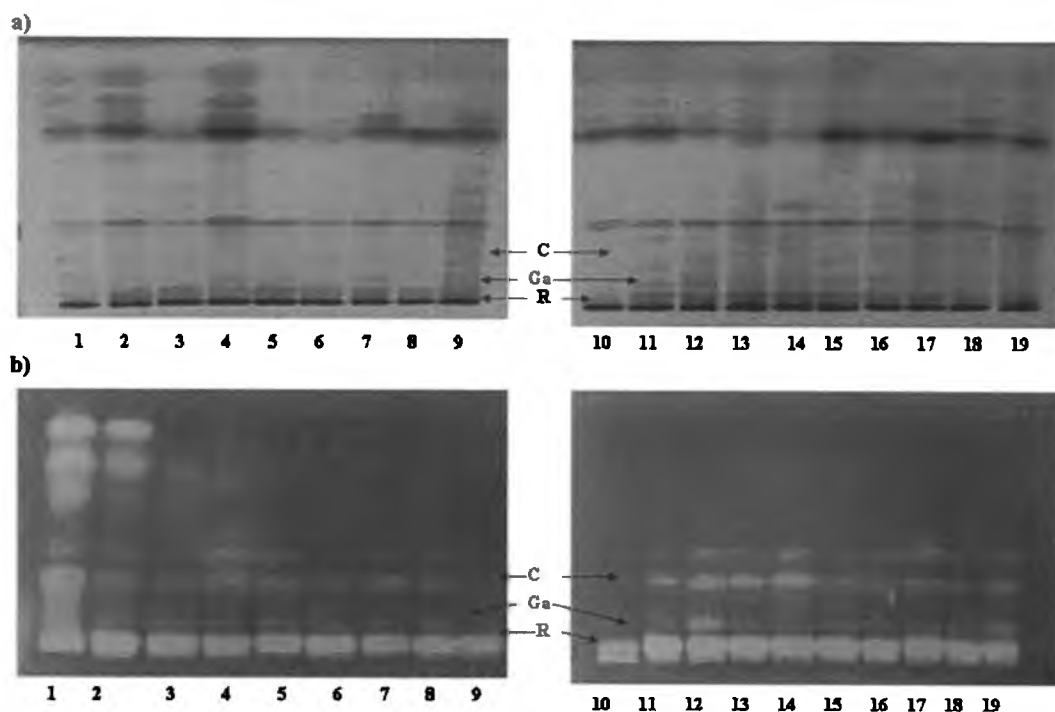


Figure 1. TLC images of compounds resolved with use of solvent system I, after spraying with (a) vanillin-sulfuric acid reagent, and (b) DPPH methanolic solution. For symbols, see Experimental.

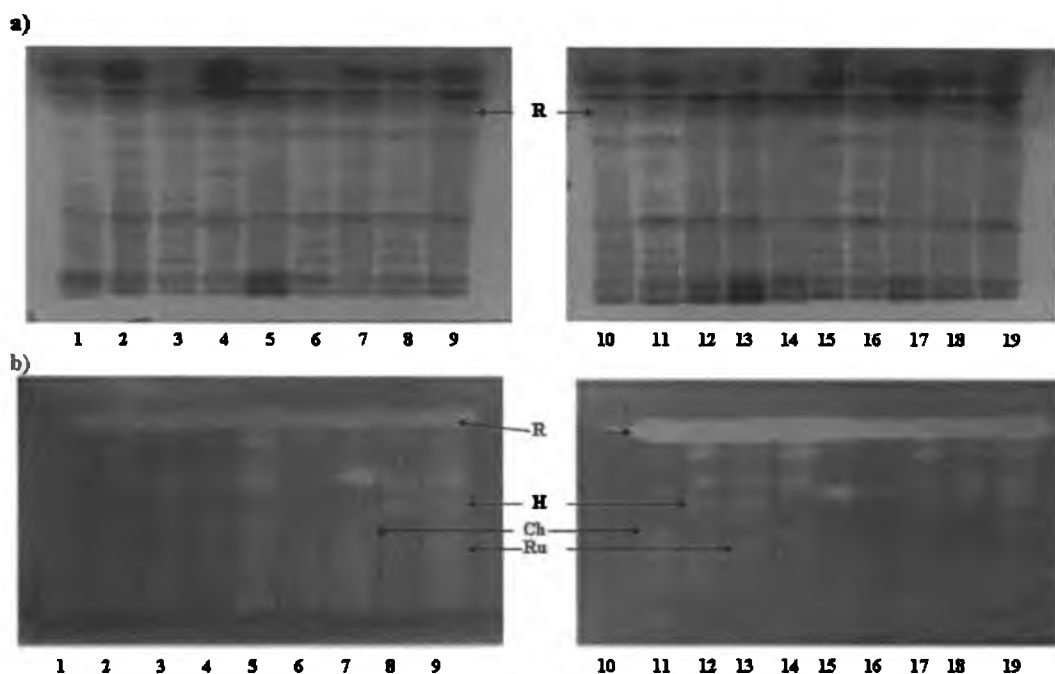


Figure 2. TLC images of compounds resolved with use of solvent system II, after spraying with (a) vanillin-sulfuric acid reagent, and (b) DPPH methanolic solution. For symbols, see Experimental.

respectively, which appear in all fingerprints, can be considered as characteristic of the chemical profiles of the *Salvia* species.

The second part of our study focused on a scrutiny of free radical scavenging properties with the separated sage constituents. To this effect, the developed plates were sprayed with the DPPH solution in methanol. Substances that exhibit antiradical

potential appeared on the chromatograms as yellow zones on the purple background (Figs 1 and 2). With the less polar fraction, the majority of the analysed species characterise with the fully analogous free radical scavenging profiles, i.e. showing four bands at R_f values equal to 0.06, 0.12, 0.22 and 0.41. In this particular fraction, three free phenolic acids (i.e. rosmarinic, gallic

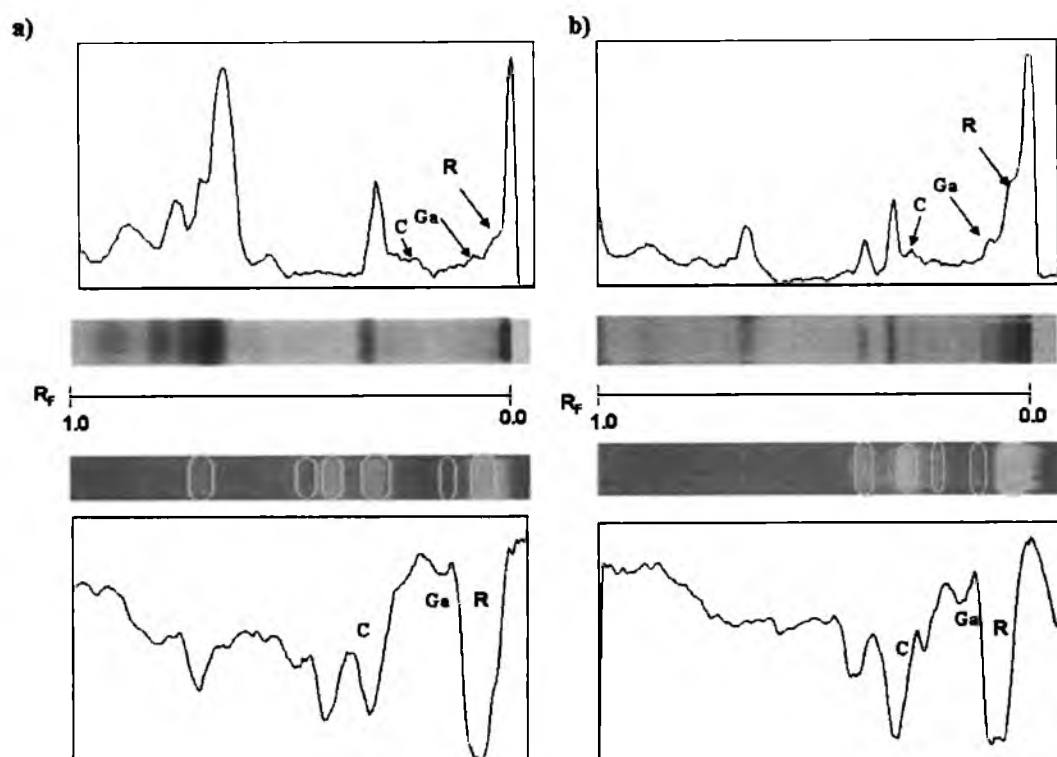


Figure 3. Comparison of chemical and free radical scavenging TLC fingerprints obtained with use of solvent system I, for the extracts prepared from two *Salvia* species: (a) *S. lavandulifolia* and (b) *S. atropatana*. For symbols, see Experimental.

and caffeic acid) were identified as exhibiting free radical scavenging properties. With all the investigated species, the strongest free radical scavenging activity was observed for rosmarinic acid. This can be concluded from the size of yellow zone corresponding to this compound, after spraying the chromatogram with the DPPH solution (Figs 3 and 4). Also for the band of caffeic acid derived from *S. officinalis* and *S. atropatana*, relatively strong free radical scavenging properties were observed (Figs 1 and 3). These results remain in a good agreement with the data referring to these two polyphenolics as to the most potent hydrogen donating free radical scavengers in the *Lamiaceae* family (Lu and Foo, 2002). The least pronounced free radical scavenging properties were found with the *Salvia deserta* extract, where the band of rosmarinic acid alone is clearly visible in the respective fingerprint. The less polar fractions derived from the four *Salvia* species (i.e. *S. officinalis*, *S. triloba*, *S. lavandulifolia* and *S. canariensis*) were characterised by the presence of a greater number of free radical scavengers having their respective R_f values equal to 0.57, 0.70 and 0.74. *S. officinalis* and *S. triloba* were the species containing the highest amounts of the constituents with the free radical scavenging properties. Almost identical chemical and free radical scavenging fingerprints suggest that these two species can possess similar chemical and antioxidant properties (as concluded in our earlier study as well, Cieřla *et al.*, 2010). In Poland, *S. officinalis* is the only pharmacopoeial species and, hence, it seems quite sensible to introduce *S. triloba* as its equivalent for medical purposes. Further justification of this statement can be the fact that *S. triloba* is reported to contain less α - and β -thujone than *S. officinalis* (Langer *et al.*, 1996; Arikat *et al.*, 2004). Control of the content of thujone in *Salvia* is very important, as thujone exhibits neurotoxic properties. The antioxidant potential of the sage extracts has been ascribed mainly to the presence of phenolic

acids (e.g. rosmarinic, gallic or caffeic acid) and flavonoids. However, the results obtained in this study show that, with several species, the free radical scavenging activity is strongly pronounced with the constituents of the less polar fraction too.

Apparently, medium and highly polar substances that remained at the start when solvent system I was used also gave intensive yellow zones, indicating their potential as free radical scavengers (Fig. 1). Thus the ability to scavenge free radicals was studied for the constituents of the more polar fraction derived from the investigated *Salvia* species and developed with solvent system II. In this fraction, the following constituents were identified: chlorogenic acid ($R_f = 0.36$), rosmarinic acid ($R_f = 0.70$), hiperoside ($R_f = 0.43$) and rutin ($R_f = 0.28$; see Fig. 2). Substances exhibiting free radical scavenging properties are located in the upper R_f range of the chromatograms obtained with solvent system II. Although the sage extracts are rich in medium and highly polar constituents, in the chromatograms the visualised yellow spots did not appear in the upper R_f range. This result can be attributed to the fact that these polar constituents are highly glycosylated, and the glycosides are reported as the less potent free radical scavengers than aglycones (Rice-Evans *et al.*, 1996). Medium and highly polar fractions of *S. farshohlei*, *S. tesquicola*, *S. cadmica*, *S. glutinosa*, *S. atropatana* and *S. nemorosa* were characterised by the greatest amounts of free radical scavengers. The least pronounced free radical scavenging properties of the polar fraction were observed with *S. lavandulifolia*, *S. sclarea*, *S. azurea* and *S. staminea*. In the case of *S. deserta*, the band of rosmarinic acid alone was detected. The R_f values of the common compounds from the investigated *Salvia* species are summarised in Table 2.

For the development of fingerprints, the identity of all the resolved bands does not need to be known. Application of the

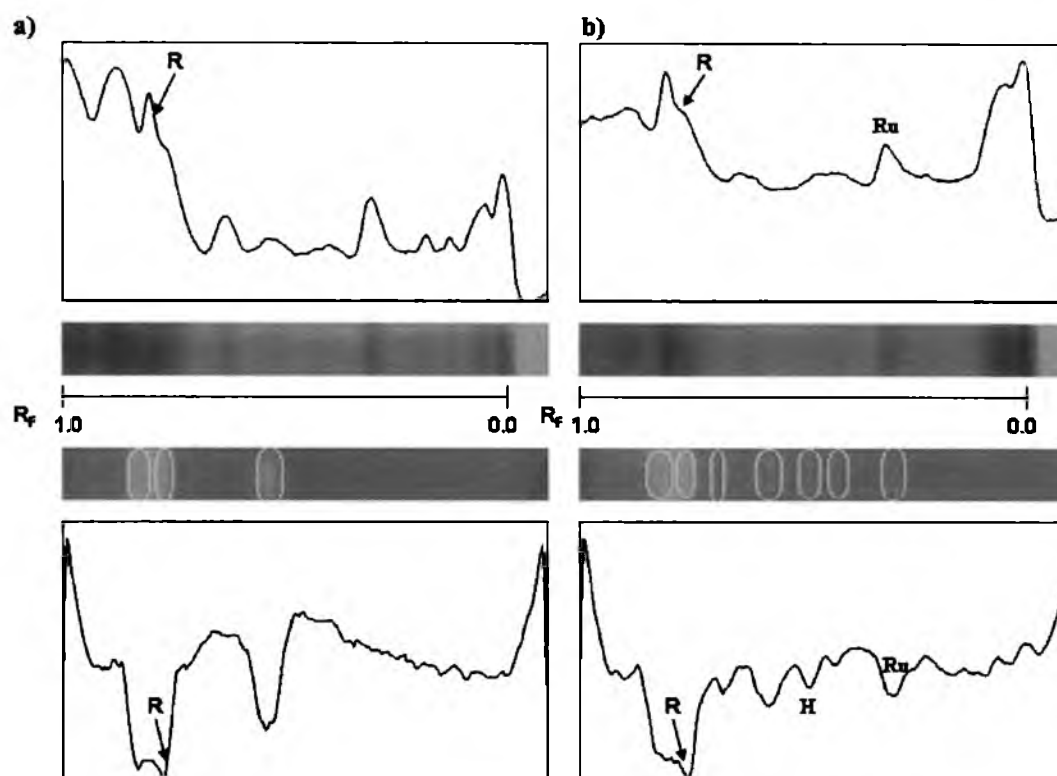


Figure 4. Comparison of chemical and free radical scavenging TLC fingerprints obtained with use of solvent system II, for the extracts prepared from two *Salvia* species: (a) *S. azurea* and (b) *S. glutinosa*. For symbols, see Experimental.

Table 2. R_F values of the common compounds characteristic for the investigated *Salvia* species' fingerprints

Sample no.	Solvent system I										Solvent system II								
	R_F										R_F								
	0.06	0.12	0.22	0.33	0.41	0.57	0.63	0.67	0.70	0.74	0.06	0.10	0.28	0.31	0.36	0.43	0.70	0.76	0.80
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
4	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
5	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X		X	X	X
6	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X			X	X	X
7	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X		X	X	X
8	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X		X	X	X	X
9	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X			X	X	X	X
10	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X			X	X	X
11	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X		X	X	X
12	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X		X	X	X	X
13	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X		X	X	X	X
14	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X		X	X	X
15	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X		X	X	X
16	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X			X	X	X
17	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X		X	X			X	X		X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X		X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X

image-processing program makes it possible to comprehensively investigate both the chromatographic and the free radical scavenging profiles. Figures 3 and 4 show the peak profiles obtained from the videoscans of the selected *Salvia* species. As can easily be noticed, several bands that are barely seen in the

TLC images (e.g. caffeic and gallic acid) produce intensive negative peaks in the DPPH test, showing a considerable free radical scavenging performance.

Validation of the method was performed according to the recognised international standards (Reich *et al.*, 2008). The proposed

method characterises with good specificity, as the analysed *Salvia* species produce distinctive fingerprints. Fingerprints obtained in the repeatability and intermediate precision test were identical in terms of the amount of peaks appearing in the individual chromatograms. Variability of the R_f values was, as follows: for the repeatability, it did not exceed 0.01, and for an intermediate precision, it was not greater than 0.03. Samples were stable when undergoing the chromatographic procedure, and showed signs neither of decomposition nor of chemisorption. The use of the vanillin–sulfuric acid visualising reagent produced more stable results (i.e. the band colors did not considerably change with time), than with the use of sulfuric acid alone. The proposed technique is also robust, i.e. significant changes in bands' colours or their R_f values were not observed when slightly changing the experimental conditions. The way of performing the validation experiments was described in detail in our earlier work (Cieřla *et al.*, 2010).

Construction of the chromatographic and the free radical scavenging fingerprints gives the possibility to comprehensively investigate the plant-derived products. The use of this procedure allows a search for the species that contain the highest amounts of free radical scavengers. This procedure can be applied for the search for new plant species that can also be used as potential herbal remedies. The proposed chromatographic procedure can be adapted to the quality control of the other plant extracts and plant-derived products.

Acknowledgements

This work was financially supported by grant no. N N405 365137 from Ministry of Science and Higher Education.

References

- Arikat NA, Jawad FM, Karam NS, Shibli RA. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mili.). *Sci Hort* **100**: 193–202.
- Bhattarai HD, Paudel B, Hong SG, Lee HK, Yim JH. 2008. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from Antarctica. *Nat Res Lett* **62**: 481–484.
- Chang YX, Ding XP, Qi J, Cao J, Kang LY, Zhu DN, Zhang BL, Yu BY. 2008. The antioxidant-activity-integrated fingerprint: an advantageous tool for the evaluation of quality of herbal medicines. *J Chromatogr A* **1208**: 76–82.
- Chang YX, Yan DM, Chen LL, Ding XP, Qi J, Kang LY, Zhang BL, Yu BY. 2009. Potency fingerprint of herbal products Danshen injection for their quality evaluation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **57**: 586–590.
- Cieřla Ł, Hajnos M, Staszek D, Wojtal Ł, Kowalska T, Waksmundzka-Hajnos M. 2010. Validated binary high-performance thin-layer chromatographic fingerprints of polyphenolics for distinguishing different *Salvia* species. *J Chromatogr Sci* (in press).
- Fan XH, Cheng YY, Ye ZL, Lin RC, Qian ZZ. 2006. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Anal Chim Acta* **555**: 217–224.
- Gu M, Zhang S, Su Z, Chen Y, Ouyang F. 2004. Fingerprinting of *Salvia miltiorrhiza* by non-aqueous capillary electrophoresis compared with high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* **1057**: 133–140.
- Jin XF, Lu YH, Wei DZ, Wang ZT. 2008. Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R.Br. by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* **48**: 100–104.
- Kelen M, Tepe B. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Biores Technol* **99**: 4096–4104.
- Kivrak I, Duru ME, Öztürk M, Mercan N, Harmandar M, Topçu G. 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chem* **116**: 470–479.
- Länger R, Mechtler Ch, Jurenitsch J. 1996. Composition of the essential oils of commercial samples of *Salvia officinalis* L. and *S. triloba* Miller: a comparison of oils obtained by extraction and steam distillation. *Phytochem Anal* **7**: 289–293.
- Liang YZ, Xie P, Chan K. 2004. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B* **812**: 53–70.
- Liu AH, Lin YH, Yang M, Guo H, Guan SH, Sun JH, Guo DA. 2007. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSⁿ. *J Chromatogr B* **846**: 32–41.
- Lu Y, Foo LY. 2002. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry* **59**: 117–140.
- Ma L, Zhang X, Zhang H, Gan Y. 2007. Development of a fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *J Chromatogr B* **846**: 139–146.
- Matkowski A, Piotrowska M. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* **77**: 346–353.
- Neungchamnong N, de Jong CF, Bruyneel B, Niessen WMA, Irth H, Ingkaninan K. 2005. HPLC coupled on-line to ESI-MS and a DPPH-based assay for the rapid identification of anti-oxidants in *Butea superba*. *Phytochem Anal* **16**: 422–428.
- Niederländer HAG, Van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. 2008. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1210**: 121–134.
- Orhan I, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yilmaz G, Kan Y, Konuklugil B, Şener B, Choudhary MI. 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chem* **103**: 1247–1254.
- Poole CF. 2003. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *J Chromatogr A* **1000**: 963–984.
- Pozharitskaya ON, Ivanova SA, Shikov AN, Makarov VG. 2008. Separation and free radical-scavenging activity of major curcuminoids of *Curcuma longa* using HPTLC-DPPH method. *Phytochem Anal* **19**: 236–243.
- Reich E, Schibli A, DeBatt A. 2008. Validation of high-performance thin-layer chromatographic methods for the identification of botanicals in a cGMP environment. *J AOAC Int* **91**: 13–20.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* **20**: 933–956.
- Rzepa J, Wojtal Ł, Staszek D, Grygierczyk G, Hajnos M, Waksmundzka-Hajnos M, Kowalska T. 2009. Fingerprint of selected *Salvia* species by HS-GC/MS analysis of their volatile fraction. *J Chromatogr Sci* **47**: 575–580.
- Tepe B. 2008. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth.) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Biores Technol* **99**: 1584–1588.
- Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, Polissiou M, Sokmen A. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem* **84**: 519–525.
- Wang Y, Kong L, Hu L, Lei X, Yang L, Chou G, Zou H, Wang C, Bligh SWA, Wang Z. 2007. Biological fingerprinting analysis of the traditional Chinese prescription Longdan Xiegan Decoction by on/off-line comprehensive two-dimensional biochromatography. *J Chromatogr B* **860**: 185–194.
- Zhang JL, Cui M, He Y, Yu HL, Guo DA. 2005. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. *J Pharm Biomed Anal* **36**: 1029–1035.

Research Article

The HPLC/DAD Fingerprints and Chemometric Analysis of Flavonoid Extracts from the Selected Sage (*Salvia*) Species

Mieczysław Sajewicz,¹ Dorota Staszek,¹ Michał S. Wróbel,¹
Monika Waksmundzka-Hajnos,² and Teresa Kowalska¹

¹ Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

² Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Pharmaceuticum, Medical University of Lublin, 4a Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

Correspondence should be addressed to Teresa Kowalska, teresa.kowalska@us.edu.pl

Received 18 July 2011; Accepted 23 August 2011

Academic Editor: Yvan Vander Heyden

Copyright © 2012 Mieczysław Sajewicz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The results of spectrophotometric and HPLC/DAD analysis are discussed, and a comparison is made of selectively extracted flavonoid fractions derived from twenty six sage species belonging to the *Salvia* genus. The sage samples were harvested in the vegetation seasons 2007, 2008, and 2009. It was a goal of this study to find out which species contain the highest yields of flavonoids (recognized for their free-radical-scavenging activity), as those with the highest yields could be applied in official medicine. It was spectrophotometrically established that the four sage species can be recognized for their highest flavonoid levels, while the HPLC/DAD analysis pointed out to the four other species. The source of the discrepancy between the two evaluation approaches was discussed. Moreover, the HPLC/DAD fingerprints of the flavonoid fraction underwent a chemometric pre-treatment, and then the purified fingerprints were analyzed by means of Principal Component Analysis (PCA) for the differences in the harvesting period. A difference was revealed between the herbs harvested in the 2007 season, and those harvested in 2008 and 2009. The main source of this difference could be the seasonal weather variation and the relatively longest storage period with the plants harvested in 2007.

1. Introduction

In spite of a vast number of the different species and a wide popularity of the plants belonging to the *Salvia* genus, relatively little attention has been paid to phytochemical analysis of these plants, prior to our own systematic research (e.g., [1–4]). In the course of the centuries, different sage species have gained the repute for their outstanding therapeutic, culinary, and decorative valor. However, the official European medicine recognizes just one sage species for its curative properties, which is *Salvia officinalis*. It is a well-known fact that the curative properties of many plants are due to the high contents of phenolics, which act as the free-radical scavengers. Thus, it became an objective of this study to analyze a selection of the different sage species popular in Central and South Europe (where they grow both in a natural habitat and as cultivars) and to fingerprint the flavonoid

fraction present therein by means of HPLC/DAD. It was our intent to ultimately point out to these *Salvia* species, which might compete with *S. officinalis* in terms of the high levels of flavonoids.

To this effect, we spectrophotometrically determined an overall content of flavonoids in the sage extracts which were selectively obtained following the pharmacopeial procedure [5]. This preliminary assessment allowed selecting four out of twenty six sage species with the highest overall contents of flavonoids (which were *S. glutinosa*^a, *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. staminea*, and *S. triloba*). For these four sage species and additionally for *S. officinalis*, a comparison was carried out of their respective HPLC/DAD fingerprints. In our earlier study [6], an analogous comparison was performed of the total sage extracts derived with the use of methanol and, hence, containing a wider spectrum of the polar components. It was expected that the fingerprints

registered for the selectively derived flavonoid fraction could better characterize the sage species than the nonselectively derived methanol extracts.

However, the flavonoid contents in the sage species, as monitored through the prism of the sums of all the separated chromatographic peak areas had to be arranged in a different order and, in this case, the four out of twenty-six sage species with the highest overall contents of flavonoids were *S. nemorosa*, *S. forskahlei*, *S. azurea*, and *S. amplexicaulis*.

The source of the discrepancy between the two assessment approaches was discussed and, additionally, a chemometric comparison was performed by means of principal component analysis (PCA) of all the sage species considered in this study, which based on the HPLC/DAD chromatograms of the flavonoid fractions. Upon the obtained results, certain conclusions were drawn regarding seasonal differences in flavonoid composition among the individual plant species.

2. Experimental

2.1. Herbal Material and Reagents. Samples of the twenty-six different sage species (which are listed in Table 1 as species 1–5, 7–26, and 28) investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in three harvesting seasons (2007, 2008, and 2009). Botany specialists identified each investigated species, and the voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University, Lublin, Poland. This plant material was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. The obtained dry material was stored in a refrigerator until commencement of the analysis. Species 6 was *S. glutinosa*^a, which originated from the natural habitat in the Ostrowsko region of south Poland and species 27 was *S. officinalis*, which originated from the natural habitat in the Zlatibor region of central Serbia. Species 6 was harvested in all three vegetation seasons (2007, 2008, and 2009), and species 27 was harvested in the summer of 2008 only and purchased dried. Summarized information about all the investigated herbal material is given in Table 1.

Methenamine was purchased from Pharma Cosmetics (Cracow, Poland), and methanol, ethyl acetate, acetone, glacial acetic acid, aluminium chloride, and hydrochloric acid used for the experiments were of analytical purity grade and purchased from POCh (Gliwice, Poland). Water was double distilled and deionized in the laboratory conditions by means of Elix Advantage model Millipore system (Molsheim, France).

2.2. Selective Extraction of Flavonoids from Herbal Material. Stock extract solution of each investigated sage species was prepared from 1 g medium powdered crude plant material. To this plant material, 20 mL acetone, 2 mL HCL (281 g L⁻¹), and 1 mL methenamine (5 g L⁻¹) were added. The entity was kept boiling on the water bath under the reflux for 30 min. Hydrolysate was filtered to the volumetric flask (100 mL). The separated plant material was extracted for the second and the third time with the 20 mL portions of

TABLE 1: Basic characteristics of the investigated plant material.

Sample no.	Sage species	Harvesting year
1	<i>S. amplexicaulis</i>	2007, 2008, 2009
2	<i>S. azurea</i>	2007, 2008, 2009
3	<i>S. cadmica</i>	2007, 2008, 2009
4	<i>S. deserta</i>	2007, 2008, 2009
5	<i>S. forskahlei</i>	2007, 2008, 2009
6	<i>S. glutinosa</i> ^a	2007, 2008, 2009
7	<i>S. hians</i>	2007, 2008, 2009
8	<i>S. jurisicii</i>	2007, 2008, 2009
9	<i>S. nemorosa</i>	2007, 2008, 2009
10	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	2007, 2008, 2009
11	<i>S. sclarea</i>	2007, 2008, 2009
12	<i>S. staminea</i>	2007, 2008, 2009
13	<i>S. stepposa</i>	2007, 2008, 2009
14	<i>S. tesquicola</i>	2007, 2008, 2009
15	<i>S. triloba</i>	2007, 2008, 2009
16	<i>S. verticillata</i>	2007, 2008, 2009
17	<i>S. officinalis</i>	2007, 2008, 2009
18	<i>S. lavandulifolia</i>	2007, 2009
19	<i>S. atropatana</i>	2007
20	<i>S. canariensis</i>	2007
21	<i>S. argentea</i>	2008, 2009
22	<i>S. austriaca</i>	2008, 2009
23	<i>S. nutans</i>	2008, 2009
24	<i>S. regeliana</i>	2008, 2009
25	<i>S. superba</i>	2008, 2009
26	<i>S. glutinosa</i>	2008
27	<i>S. officinalis</i> ^b	2008
28	<i>S. pratensis</i>	2009

^aSample originating from the natural habitat in the Ostrowsko region of south Poland.

^bSample originating from the natural habitat in the Zlatibor region of central Serbia.

acetone kept boiling for 10 min. All extracts were filtered to the same volumetric flask, and acetone was added to make up to 100 mL. Then, 20 mL of the obtained solution was transferred to the separation funnel, 20 mL water was added, and the entity was extracted with ethyl acetate (firstly with the 15 mL, and then three times with the 10 mL portions of ethyl acetate). The separated organic layers were collected jointly and twice washed with the 40 mL portions of water. The organic layer was filtered to the 50 mL volumetric flask and filled up to the volume with ethyl acetate. Selective extraction of flavonoids from the investigated plant material was carried out in triplicate from the three different plant samples belonging to each individual batch of the sage species. The procedure of selective extraction is described in [5].

2.3. Spectrophotometric Determination of the Overall Content of Flavonoids. Flavonoids were determined spectrophotometrically according to the procedure described in [5],

using the selectively obtained flavonoid fraction extracts. Each result presented in this study is a mean value from the three independent spectrophotometric measurements obtained for each individual extract. An overall (%) content of flavonoids was recalculated for hyperoside, using the recalculation factor (k).

For each spectrophotometric measurement, two solutions were prepared. Solution 1 was prepared in the following way: to the 10 mL stock extract solution, 2 mL aluminium chloride (20 g L^{-1}) solution was added and filled up to 25 mL with the 1 : 19 mixture of acetic acid and methanol. Solution 2 was the reference sample, and it was prepared as follows: 10 mL stock solution was filled up to 25 mL with the 1 : 19 mixture of acetic acid and methanol. After 45 min from the preparation of these two solutions, absorbance of sample 1 was measured at the wavelength $\lambda = 425 \text{ nm}$, using sample 2 as a blank. The percentage (%) content of total flavonoids (X) was calculated, using the following formula [5]:

$$X = \frac{A \cdot k}{m}, \quad (1)$$

where A is the absorbance of the examined solution, k is the recalculation factor for hyperoside ($k = 1.25$), and m is the weight of the crude plant material (in grams).

The obtained quantitative results (i.e., the overall contents of flavonoids in the percentage scale) for all the investigated sage species are given in form of the bar diagram in Figure 1.

2.4. The HPLC/DAD Fingerprinting. The HPLC analysis was carried out with a Varian 920-LC model liquid chromatograph (Harbor City, Calif, USA) equipped with a 900-LC model autosampler, gradient pump, 330 model DAD, and the Galaxie software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the gradient mode using a Pursuit C18 ($5 \mu\text{m}$ particle size) column ($250 \times 4.6 \text{ mm}$ id; Varian; Cat. no. 1215-9307). Methanol (A) and water (with a 1% (v/v) amount of glacial acetic acid; (B)) were used in the following A + B gradient program (ν/ν): from 0 to 17 min, 50 + 50; from 18 to 26 min, 80 + 20; from 27 to 46 min, 90 + 10; from 47 to 58 min, 100 + 0; from 59 to 70 min, 50 + 50. The flow rate was 0.6 mL min^{-1} . The chromatograms were registered at the wavelength $\lambda = 254 \text{ nm}$.

2.5. Chemometric Baseline and Noise Correction of Chromatograms. Dealing with the chromatograms of natural samples is not an easy task, although the fingerprinting approach has long been used for rapid screening of complex analytical signals. It has also been used in our earlier phytochemical study of the sage species [7]. In this section, a short description of the applied chemometric techniques is given, aiming to remove the background and noise from the HPLC/DAD chromatograms, and in that way to prepare the input data for the further exploration and visualization thereof with the use of the principal component analysis (PCA).

The first step was elimination of the background component from the chromatograms. One of numerous baseline

elimination techniques is the penalized asymmetric least squares approach (PALS) [8]. This method applies the least squares approach to fit a baseline to the signal. Each point of a signal gets a different weight which locates it above or below the original signal. The weights are modified according to an iterative procedure such that the points above the original signal have very small weights and the points below this signal have the weights close to 1. There are two adjustable parameters, that is, the order of the differences and the penalty parameter, which are to be optimized. Usually, the order of the differences is set as equal to 2. The larger the penalty parameter is, the smoother baseline is obtained.

Chromatographic signals were smoothed to suppress the white (Gaussian) noise. In this study, the Savitzky-Golay differentiation filter [9] was used. This filter helps to reduce the peak overlapping and the linear baseline drift by constructing the first and the second derivative spectra. The Savitzky-Golay filter technique resembles the local polynomial regression with a window of at least $f + 1$ points, where f is the polynomial degree.

Also, the other undesired effects that could be present in the raw data were eliminated using the standard normal variate transformation (SNV) [10]. The pretreated data were used as the input data for principal component analysis (PCA) and discriminant partial least squares (DPLS).

2.6. Principal Component Analysis (PCA). Principal component analysis (PCA) is the data exploration and visualization technique [11]. It allows to construct a set of new variables called principal components (PCs). The principal components are the orthogonal vectors that are linear combinations of the original variables and represent the data structure by maximizing the description of data variance. The PCA model consists of k principal components, where k is selected by the user. The original data matrix $X(m \times n)$ is decomposed according to the following formula:

$$X = TP^T + E, \quad (2)$$

where $T(m \times k)$ is the matrix of scores, $P(n \times k)$ is the matrix of loadings, $E(m \times n)$ is the residual matrix, and the superscript T denotes transposition of the matrix.

As a projection method, PCA enables projection of the objects or variables on the planes which they define [12]. Projection of the samples on the plane defined by the selected pairs of PCs allows studying the similarities among the samples (in form of the score plots). The loading plots are the projections of the variables on the planes of the selected principal components and allow tracing correlations among the data variables.

2.7. Discriminant Partial Least Squares (DPLS). The discriminant partial least squares approach (DPLS) [13] is widely applied in chemistry, because of the multivariate character of the data studied and the high correlation usually observed among the explanatory variables. With the DPLS model, a linear relationship between a property of interest and a set of the explanatory variables is described. The property of interest is usually a binary or a bipolar coded vector. The

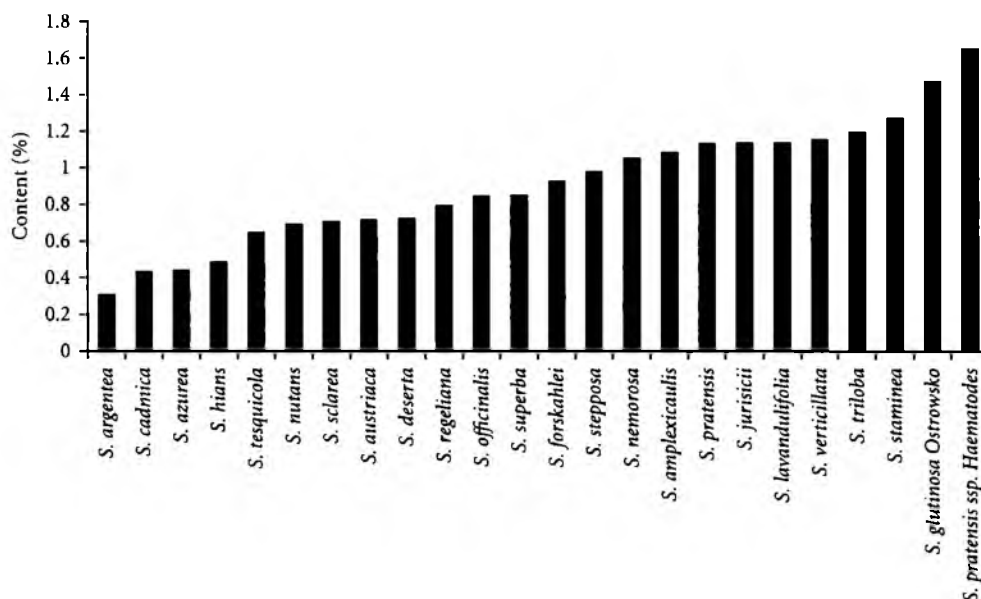


FIGURE 1: A bar diagram comparison of the overall contents of flavonoids in all the sage species harvested in 2009.

explanatory variables can be the sets of instrumental signals, for example, the chromatograms. Via the DPLS model, a set of a few orthogonal factors is constructed, aiming to maximize the covariance of the explanatory variables with the property of interest. When constructing the model, a number of orthogonal factors need to be estimated, which is usually done through the cross-validation mode. The final model is delivered in the form of the regression coefficients vector.

3. Results and Discussion

3.1. The HPLC/DAD Fingerprinting and Spectrophotometric Results. From a comparison of the HPLC/DAD fingerprints obtained for twenty-four selective extracts of flavonoids derived from the different sage species harvested in 2009, it was observed that the chromatogram of *S. nemorosa* shows both the highest number of the fourteen separated peaks and the highest sum of the separated peak areas (1244 mAV \times min). The same species showed one of the highest numerical values of the sum of the separated peak heights (1893.5 mAV).

To the contrary, the chromatogram of the flavonoid extract from *S. cadmica* is characterized with the lowest number of the four separated peaks. Accordingly, the sums of the separated peak heights and the sums of the separated peak areas for this particular sage species were obtained among the lowest numerical levels (630.4 mAV \times min and 1507.7 mAV, resp.).

On the basis of the chromatographic results, the following sage species are those with the highest sums of the separated peak areas and/or the highest sums of the separated peak heights: *S. amplexicaulis*, *S. azurea*, *S. forskahlei*, *S. hians*, and *S. nemorosa*. Sage species showing the lowest sums of the separated peak areas and/or the lowest sums of the separated peak areas are the following ones: *S. cadmica*,

S. nutans, *S. officinalis*, *S. regeliana*, and *S. triloba*. Numbers of the separated chromatographic peaks, sums of the separated peak areas, and sums of the separated peak heights for all the investigated sage species are given in Table 2. For the sake of graphical illustration, in Figure 2(a), we presented selected chromatographic fingerprints of the four sage species with the highest sums of the separated peak areas and also the fingerprint of *S. officinalis*. *Salvia officinalis* was compared with these four species, due to its unique position in the traditional European medicine, in spite of the lowest overall percentage content of flavonoids among the five compared species. The chromatogram of the *S. officinalis* extract fully confirmed the spectrophotometric findings. Its fingerprint is characterized with a relatively low number of the six separated peaks, and with the relatively low sums of the separated peak areas and the peak heights (676.1 mAV \times min and 1377.4 mAV, resp.).

According to the spectrophotometric results (Figure 1), the following sage species: *S. glutinosa*^a, *S. pratensis ssp. Haematodes*, *S. staminea*, and *S. triloba* were characterized with the highest overall percentage contents of flavonoids, as recalculated to hyperoside.

Salvia triloba is one of the four sage species showing the higher overall percentage contents of flavonoids, as established spectrophotometrically. However, on the chromatogram of this species, we found seven separated peaks only, and the sums of their areas and heights are not very impressive either (although higher than with *S. officinalis*).

The second out of the four is *S. staminea*, which according to the spectrophotometric result is richer in flavonoids than *S. triloba* and *S. officinalis*. The chromatographic results confirmed the spectrophotometric ones. On the chromatogram of the flavonoid fraction derived from *S. staminea*, we found nine separated peaks, and the sums of their areas and heights are the highest ones among the selected four.

TABLE 2: A comparison of the numbers of the separated chromatographic peaks, and of the sums of the separated peak heights and peak areas with twenty-four different sage species harvested in 2009. Numbering of the sage samples is in conformity with Table 1.

Sample no.	Sage species	No. of separated peaks	Sum of separated peak heights (mAV)	Sum of separated peak areas (mAV \times min)
1	<i>S. amplexicaulis</i>	7	1906.3	1038.2
2	<i>S. azurea</i>	6	1856.3	1168.3
3	<i>S. cadmica</i>	4	1507.7	630.4
4	<i>S. deserta</i>	6	1666.3	740.8
5	<i>S. forskahlei</i>	8	2041.6	1238.3
6	<i>S. glutinosa</i> ^a	8	1630.3	895.8
7	<i>S. hians</i>	11	1951.7	1009.0
8	<i>S. jurisicii</i>	13	1643.7	847.0
9	<i>S. nemorosa</i>	14	1893.5	1244.0
10	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	12	1635.5	903.4
11	<i>S. sclarea</i>	5	1610.7	852.3
12	<i>S. staminea</i>	9	1980.8	948.0
13	<i>S. stepposa</i>	9	1646.1	632.3
14	<i>S. tesquicola</i>	9	1665.8	667.4
15	<i>S. triloba</i>	7	1586.4	669.4
16	<i>S. verticillata</i>	7	1711.7	878.8
17	<i>S. officinalis</i>	6	1377.4	676.1
18	<i>S. lavandulifolia</i>	9	1614.3	837.4
21	<i>S. argentea</i>	9	1634.1	981.5
22	<i>S. austriaca</i>	8	1561.0	930.0
23	<i>S. nutans</i>	7	1464.7	609.4
24	<i>S. regeliana</i>	7	1487.9	806.6
25	<i>S. superba</i>	6	1993.5	886.4
28	<i>S. pratensis</i>	9	1600.7	927.6

The third species (*S. glutinosa*^a) showed the highest overall content of flavonoids among the four species. On its fingerprint chromatogram, eight separated peaks can be found, and the sums of their areas and heights are 895.8 mAV \times min and 1630.3 mAV, respectively. These values are lower than those chromatographically obtained for *S. staminea*, yet higher than with *S. officinalis* and *S. triloba*.

The fourth spectrophotometrically selected species is *S. pratensis* ssp. *Haematodes* as that with the relatively highest percentage content of flavonoids. On its chromatogram, the highest number of the twelve separated peaks was observed among the four compared species (and *S. officinalis*). Sums of their areas and heights were, respectively, 903.4 mAV \times min and 1635.5 mAV. For the sake of graphical illustration, in Figure 2(b), we presented selected chromatographic fingerprints of the four sage species with the highest overall percentage contents of flavonoids, as spectrophotometrically assessed and recalculated to hyperoside, and also the fingerprint of *S. officinalis*.

The perceptible discrepancy between the spectrophotometric and the chromatographic results (which can anyway be considered as semiquantitative only) is due to the different principles and also different sensitivities of the two analytical

approaches. Spectrophotometric analysis assumes a very simplifying recalculation of the overall flavonoid contents to hyperoside. On the other hand, the chromatographic fingerprinting is certainly more sensitive, although in spite of the selective and flavonoids-oriented extraction, one cannot exclude the presence of the compounds other than flavonoids in the chromatographed extracts, which might result in a different source of the estimation error. This is the reason why these two approaches have been presented and compared in this study.

3.2. Chemometric Evaluation of Chromatographic Fingerprints. In this study, a set of herbal fingerprints obtained from HPLC/DAD for the *Salvia* species was analyzed with the use of the chemometric techniques. Firstly, we enhanced the signal-to-noise ratio. To this effect, the background removal was carried out by application of the PALS method. Also, the noise influence was reduced with the use of the Savitzky-Golay smoothing filter, which delivered smoothed signals. For all the assessed fingerprints, the penalty parameter used in the PALS method was set to 10^7 and the Savitzky-Golay standard Matlab command of 51 frame size was applied. In Figure 3, we showed the baselines of the chromatograms and

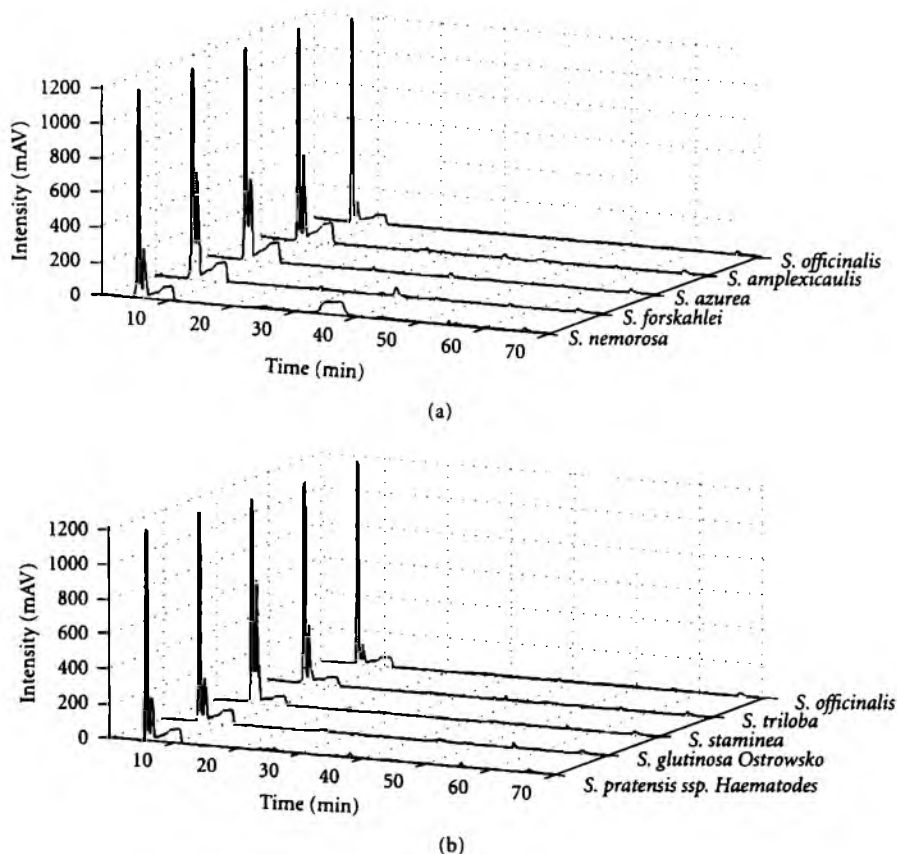


FIGURE 2: (a) A comparison of the HPLC/DAD fingerprints for the five different sage species (*S. nemorosa*, *S. forskahlei*, *S. azurea*, *S. amplexicaulis*, and *S. officinalis*). The chromatograms were registered at the wavelength $\lambda = 254$ nm. All fingerprints except for *S. officinalis* are those with the highest sums of the separated chromatographic peak areas. (b) A comparison of the HPLC/DAD fingerprints for the five different sage species (*S. glutinosa* Ostrowsko, *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. staminea*, *S. triloba*, and *S. officinalis*). The chromatograms were registered at the wavelength $\lambda = 254$ nm. All fingerprints except for *S. officinalis* are those with the highest overall sums of flavonoids, as spectrophotometrically established.

also the signals after performance of the preprocessing step. Finally, the SNV transformation was applied to the signals which were analyzed further in that form.

On the score plots shown in Figure 4, three groups of the *Salvia* samples can be distinguished. One can easily notice that the sage samples collected in the 2007 vegetation season markedly differ from the remaining ones in the space of PC1, which describes nearly 70% of data variance (Figure 5). Real cause of this difference remains unknown, yet it can be due to the local weather changes and/or due to the relatively longest storage period with the plant samples collected in 2007.

We tried to distinguish samples originating from the 2007 vegetation season from the remaining ones in another way also, which was achieved by application of the discriminant partial least squares model (DPLS) [13]. All samples were split into the two sets using the Kennard and Stone approach [14], namely into the training and the test set. With this algorithm, all kinds of samples are included in the training set, what provides the representativeness of the training set. The training set consisted of 17 samples from each of the two classes (class 1 was valid for the 2007 vegetation season samples and class 2 for the 2008 and 2009 samples), and the

test set contained all the remaining samples. Due to a rather limited number of the available samples, the cross-validation leave-3-out method was used to estimate the complexity of the DPLS model and the eight latent factors were chosen (Figure 6). The correct classification rate (CCR) was used as the model characterization parameter, and the sensitivity and specificity parameters were calculated (Table 3). The CCR for the model set characterizes the fitting of the model to the data, and for the test set it describes predictive power of the model. Finally, we obtained the 84.38% correctly classified samples from the independent test set, which was a reasonably satisfying result (additionally confirming correctness of distinguishing the 2007 sage samples from the remaining specimens studied). All calculations and chemometric treatment were applied via the R2010a Matlab by the MathWorks and its toolboxes.

4. Conclusions

Upon the spectrophotometric results, we compared twenty-four different sage species harvested in 2009 in terms of the overall percentage contents of flavonoids (recalculated

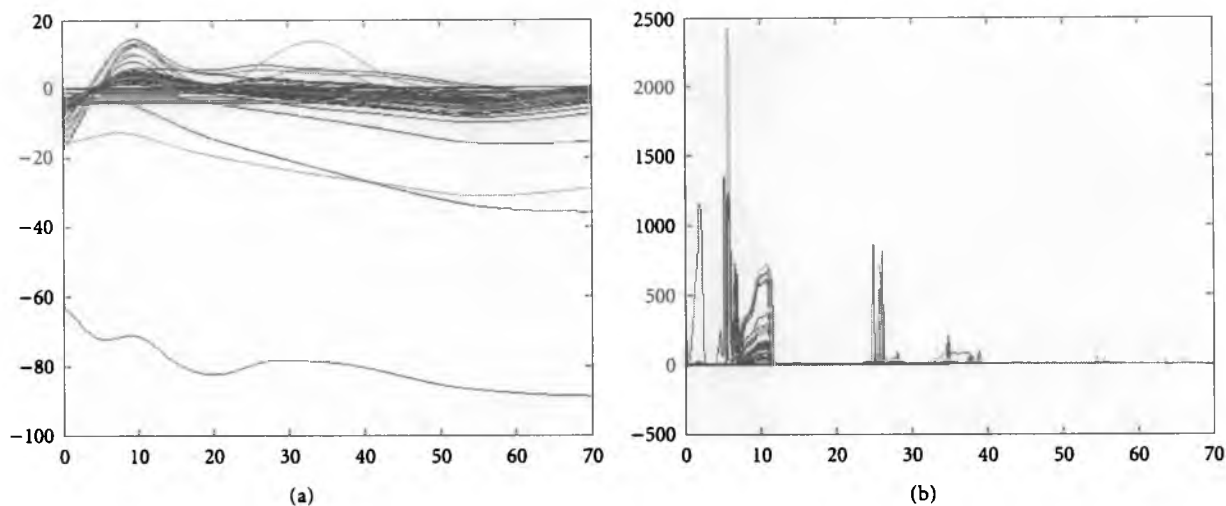


FIGURE 3: The HPLC/DAD profiles of the different *Salvia* species extracts: (a) with the baseline and (b) after the baseline and noise removal.

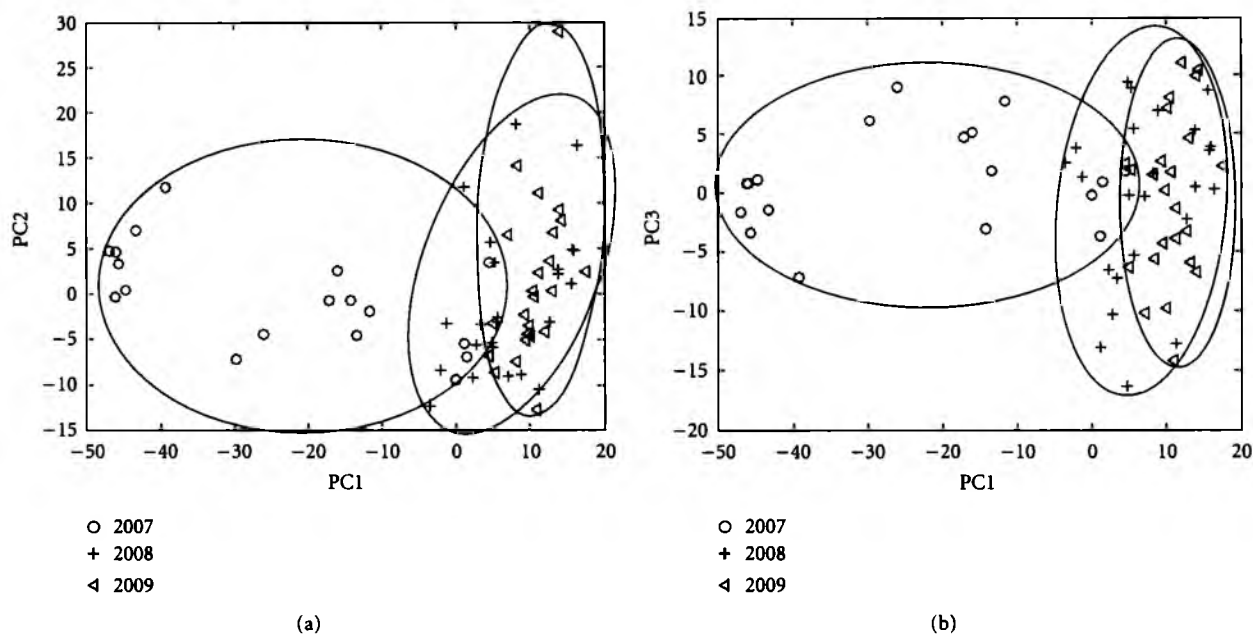


FIGURE 4: Plots of the *Salvia* samples on the plane determined by (a) the first and the second principal component and (b) the first and the third principal component.

to the contents of hyperoside) and, on this basis, we selected those showing the highest overall percentage contents (i.e., *S. glutinosa*^a, *S. pratensis* ssp. *Haematodes*, *S. staminea*, and *S. triloba*).

From the HPLC/DAD comparison of the fingerprints valid for the same twenty-four different sage species and from the comparison of the chromatograms with the highest sums of the chromatographic peak areas, the following sage species: *S. nemorosa*, *S. forskahlei*, *S. azurea*, and *S. amplexicaulis* could be selected as those with the highest overall contents of flavonoids.

A comparison of the spectrophotometric data with the results of the chromatographic fingerprinting allowed for

TABLE 3: Model parameters. where SE is sensitivity, SP is specificity, and CCR is the correct classification rate for the training and the test set, respectively.

	Training set	Test set
SE	94.18	88.00
SP	100	71.43
CCR	97.06	84.38

a conclusion as to the perceptible discrepancy between the results of these two approaches. This discrepancy apparently is due to the different principles and also different

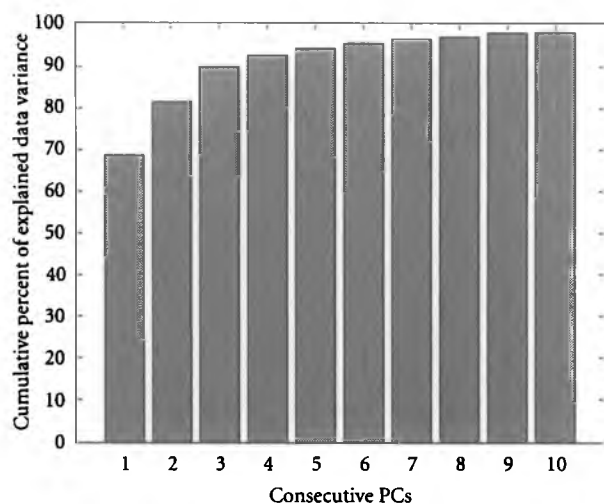


FIGURE 5: The cumulative percent of the explained data variance by the consecutive principal components.

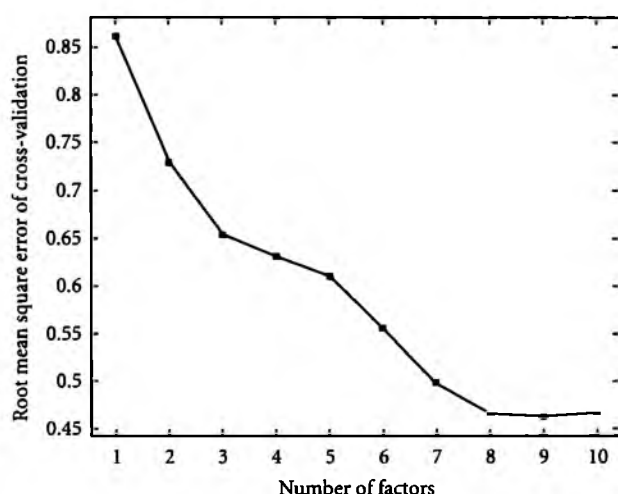


FIGURE 6: The cross-validation error for estimation of the model complexity.

sensitivities of each analytical technique applied. Due to completely different error sources in each approach and also to an unknown chemical composition of the fingerprinted extracts, for the time being, it seems noteworthy to pay roughly equal attention to the two series of the obtained results.

In spite of the differences in the spectrophotometric and chromatographic results, it can be concluded that, in terms of the flavonoid fraction contents, many individual sage species outperform *S. officinalis*.

The chromatographic fingerprints of the selectively derived flavonoid extracts proved useful for the construction of the chemometric models. In this study, they proved helpful in differentiating among the harvesting years with the investigated *Sage* species.

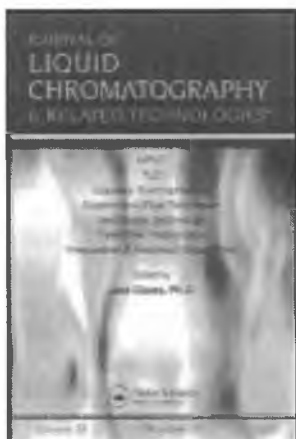
Acknowledgments

The work of two authors (D. Staszek and M. S. Wróbel) was partially supported by the Ph.D. scholarship granted to them in 2010 within the framework of the University as a Partner of the Economy Based on Science project subsidized by the European Social Fund of the European Union.

References

- [1] J. Rzepa, Ł. Wojtal, D. Staszek et al., "Fingerprint of selected *Salvia* species by HS-GC-MS analysis of their volatile fraction," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 47, no. 7, pp. 575–580, 2009.
- [2] Ł. Cieśla, M. Hajnos, D. Staszek, Ł. Wojtal, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, "Validated binary high-performance thin-layer chromatographic fingerprints of polyphenolics for distinguishing different *Salvia* species," *Journal of Chromatographic Science*, vol. 48, no. 6, pp. 421–427, 2010.
- [3] Ł. Cieśla, D. Staszek, M. Hajnos, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, "Development of chromatographic and free radical scavenging activity fingerprints by thin-layer chromatography for selected *Salvia* species," *Phytochemical Analysis*, vol. 22, no. 1, pp. 59–65, 2011.
- [4] M. Sajewicz, D. Staszek, M. Natić, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska, "TLC-MS versus TLC-LC-MS fingerprints of herbal extracts. Part II. Phenolic acids and flavonoids," *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol. 34, no. 10-11, pp. 864–887, 2011.
- [5] Polish Pharmaceutical Society, *Polish Pharmacopoeia VI*, Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, Poland, 2002.
- [6] M. Sajewicz, D. Staszek, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Hajnos, and M. Waksmundzka-Hajnos, "Binary HPLC-Diode Array Detector and HPLC-Evaporative Light Scattering Detector fingerprints of methanol extracts from the selected sage (*Salvia*) species," *Journal of AOAC International*, vol. 94, pp. 71–76, 2011.
- [7] M. Daszykowski, M. Sajewicz, J. Rzepa et al., "Comparative analysis of the chromatographic fingerprints of twenty different sage (*Salvia* L.) species," *Acta Chromatographica*, vol. 21, no. 4, pp. 513–530, 2009.
- [8] P. H. C. Eilers, "A perfect smoother," *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 14, pp. 3631–3636, 2003.
- [9] A. Savitzky and M. J. E. Golay, "Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures," *Analytical Chemistry*, vol. 36, no. 8, pp. 1627–1639, 1964.
- [10] R. J. Barnes, M. S. Dhanoa, and S. J. Lister, "Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra," *Applied Spectroscopy*, vol. 43, no. 5, pp. 772–777, 1989.
- [11] S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi, "Principal component analysis," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 2, no. 1–3, pp. 37–52, 1987.
- [12] M. Daszykowski, B. Walczak, and D. L. Massart, "Projection methods in chemistry," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 65, no. 1, pp. 97–112, 2003.
- [13] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997.
- [14] R. W. Kennard and L. A. Stone, "Computer aided design of experiments," *Technometrics*, vol. 11, pp. 137–148, 1969.

This article was downloaded by: [Uniwersytet Slaski W Katowicach], [Teresa Kowalska]
On: 25 June 2012, At: 08:32
Publisher: Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered
office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/ljlc20>

COMPARISON OF TLC AND HPLC FINGERPRINTS OF PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS FRACTIONS DERIVED FROM SELECTED SAGE (SALVIA) SPECIES

Mieczyslaw Sajewicz^a, Dorota Staszek^a, Monika Waksmundzka-Hajnos^b & Teresa Kowalska^a

^a Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

^b Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

Available online: 03 May 2012

To cite this article: Mieczyslaw Sajewicz, Dorota Staszek, Monika Waksmundzka-Hajnos & Teresa Kowalska (2012): COMPARISON OF TLC AND HPLC FINGERPRINTS OF PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS FRACTIONS DERIVED FROM SELECTED SAGE (SALVIA) SPECIES, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 35:10, 1388-1403

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2012.676463>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

COMPARISON OF TLC AND HPLC FINGERPRINTS OF PHENOLIC ACIDS AND FLAVONOIDS FRACTIONS DERIVED FROM SELECTED SAGE (SALVIA) SPECIES

Mieczyslaw Sajewicz,¹ Dorota Staszek,¹ Monika Waksmundzka-Hajnos,² and Teresa Kowalska¹

¹Institute of Chemistry, University of Silesia, Katowice, Poland

²Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

□ This study is part of a larger project on the contents and composition of essential oils, phenolic acids, and flavonoids originating from over twenty species belonging to the *Salvia* genus. These herbs are recognized in the traditional European pharmacy and cuisine for their curative and aromatic properties, and yet they have not attracted sufficient attention from the side of phytochemists. Thus, it seemed inevitable to focus on the contents of the phenolics in the individual sage species, basically due to the recognized antioxidant properties of this class of compounds. In this paper, we compared the results of a spectrophotometric assessment of the overall contents of phenolic acids and flavonoids (selectively extracted from twenty three different *Salvia* species) with those of a more detailed analysis carried out with use of HPLC/DAD and the TLC-based video imaging. Six species with the highest contents of phenolic acids and five species with the highest contents of flavonoids, and additionally *Salvia officinalis*, were chosen for the chromatographic fingerprinting of the selectively extracted fractions of the free and bonded phenolic acids, and the flavonoid aglycons and glycosides. As *Salvia officinalis* is the only representative of the discussed genus recognized as a medicinal plant by Polish Pharmacopoeia, our goal was to compare its phenolic contents with those of the other phenolic-rich sage species. This part of our sage investigation project has methodological importance and shows how thin-layer chromatographic video imaging can be used in a phytochemical study in combination with other analytical techniques.

Keywords flavonoids, HPLC/DAD fingerprinting, phenolic acid, *salvia* spp, selective extraction, TLC video image fingerprinting

INTRODUCTION

Phenolic compounds count among the most important groups of secondary metabolites produced by plants and they are characterized by at least one aromatic ring (C6) substituted by one or more hydroxyl groups. Phenolics are synthesized mainly from cinnamic acid, which is formed from

Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006, Katowice, Poland. E-mail: teresa.kowalska@vs.edu.pl

phenylalanine by the *L*-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) action, the branch point enzyme between the primary (shikimate pathway) and the secondary (phenylpropanoid pathway) metabolism.^[1] The significance of this route can be supported by the fact that 20% of carbon fixed by the plants under the normal growth conditions flows through this particular pathway.^[1]

Phenolics are divided into several groups, differentiated by the number of the constitutive carbon atoms in conjunction with the structure of the basic phenolic skeleton (simple phenols, phenolic acids, phenylpropanoids, and flavonoids).

Phenolics play various different roles in plants. Enhanced amounts of the phenolics can be observed under the different environmental factors and stress conditions. Synthesis of isoflavones and some other flavonoids is stimulated, when plants are infected or injured or suffer from low temperatures and low nutrient conditions. Plants accumulate the UV-absorbing flavonoids and the other phenolic compounds mainly in vacuoles of epidermal cells to prevent penetration of UV-B light and the other stress agents into the deeper tissues of the plant.^[1]

Phenolics display an array of the health-promoting benefits. They are of current interest due to their important biological and pharmacological properties, especially the anti-inflammatory, antioxidant, and antimutagenic, as well as anticarcinogenic activities.^[2] Most phenolic compounds exhibit antimicrobial activity also.^[1] For all these reasons, flavonoids are considered as important components of human diet and their intake is through the consumption of vegetables, fruit, red wine, tea, beer, and so forth. Another significant source of flavonoids are the different medicinal plants and the related phytomedicines.^[2] For all these reasons, the main focus in phytomedicine often is the total content of the phenolics and particularly the analysis of the phenolic fraction in plant material.

The aim of this work is to demonstrate an insufficiency of screening the total content of the phenolics in the plant material and the importance of the complementary application of the different analytical techniques (spectrophotometry, HPLC/DAD, and TLC video imaging) to this screening upon the example of the *Salvia* species cultivated in Poland, in the search for the most active herbs that can be used as culinary spices or natural remedies, along with the most frequently used *S. officinalis* herb.

EXPERIMENTAL

Materials and Reagents

Samples of 23 different sage species listed in Table 1 (except of species no. 8) and investigated in this study were collected in the Pharmacognosy

TABLE 1 Twenty Three Species of the *Salvia* Genus Harvested in 2009, the Percent Total Phenolic Acids [\bar{X} ; Eq. (1)], the Percent Total Flavonoids [\bar{X} ; Eq. (2)], and the Respective Relative Standard Deviations (RSD)

No.	Species	Total Phenolic Acids (%) \pm RSD (%)	Total Flavonoids (%) \pm RSD (%)
1	<i>S. amplexicaulis</i>	0.730 \pm 0.032	0.629 \pm 0.150
2	<i>S. argentea</i>	0.311 \pm 0.035	0.308 \pm 0.001
3	<i>S. austriaca</i>	0.182 \pm 0.016	0.403 \pm 0.343
4	<i>S. azurea</i>	0.853 \pm 0.143	0.277 \pm 0.178
5	<i>S. cadmica</i>	0.821 \pm 0.123	0.367 \pm 0.074
6	<i>S. deserta</i>	0.749 \pm 0.019	0.462 \pm 0.286
7	<i>S. forskahlei</i>	0.781 \pm 0.077	0.675 \pm 0.275
8	<i>S. glutinosa</i>	0.399 \pm 0.072	1.166 \pm 0.341
9	<i>S. hians</i>	0.885 \pm 0.133	0.510 \pm 0.028
10	<i>S. lavandulifolia</i>	0.412 \pm 0.050	0.900 \pm 0.264
11	<i>S. nemorosa</i>	0.537 \pm 0.107	0.689 \pm 0.401
12	<i>S. nutans</i>	0.132 \pm 0.027	0.595 \pm 0.108
13	<i>S. pratensis</i>	0.302 \pm 0.012	0.760 \pm 0.411
14	<i>S. pratensis</i> ssp. <i>Haematodes</i>	0.255 \pm 0.018	1.204 \pm 0.495
15	<i>S. regeliana</i>	0.666 \pm 0.049	0.589 \pm 0.223
16	<i>S. sclarea</i>	1.034 \pm 0.092	0.716 \pm 0.012
17	<i>S. staminea</i>	1.001 \pm 0.026	1.286 \pm 0.020
18	<i>S. stepposa</i>	0.443 \pm 0.018	0.784 \pm 0.215
19	<i>S. superba</i>	0.779 \pm 0.082	0.748 \pm 0.113
20	<i>S. tesquicola</i>	0.406 \pm 0.022	0.557 \pm 0.099
21	<i>S. triloba</i>	0.406 \pm 0.032	1.078 \pm 0.132
22	<i>S. verticillata</i>	0.856 \pm 0.120	1.160 \pm 0.001
23	<i>S. officinalis</i>	0.122 \pm 0.009	0.708 \pm 0.151

Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in the 2009 harvesting season. Species 8 was *S. glutinosa*, which was harvested in the same year from the natural habitat in the Ostrowsko region of South Poland. Botany specialists identified each investigated species, and the voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University, Lublin, Poland. This plant material was dried for 40 hr in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. The obtained dry material was stored in a refrigerator until the commencement of the analysis.

Methenamine was purchased from Pharma Cosmetics (Cracow, Poland), acetonitrile, methanol, butanol, benzene, ethyl acetate, acetone, petroleum ether, diethyl ether, toluene, formic acid, glacial acetic acid, hydrochloric acid, sulfuric acid, sodium hydroxide, barium hydroxide, sodium bicarbonate, sodium carbonate, sodium molybdate, sodium nitrate, anhydrous sodium sulfate, sodium borohydride, and aluminum chloride used for the experiments were of the analytical purity grade and purchased from POCh (Gliwice, Poland). Water was double distilled and de-ionized in the laboratory conditions by means of Elix Advantage model Millipore system (Molsheim, France).

Selective One-Step Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids From Herbal Material

Phenolic Acids

Ten grams of the finely powdered plant material were placed in a 250-mL round-bottomed flask on the water bath under the reflux and the sample was three times extracted with the consecutive 50-mL portions of methanol. The methanol extracts were combined and then evaporated under the reduced pressure to dryness. Dry residue was dissolved in 20 mL hot water and then left in the refrigerator for 24 hr. Finally, the precipitate was filtered off, and the filtrate was placed in a volumetric flask and made up to 100 mL with water. Selective extraction of phenolic acids from the investigated plant material was carried out in duplicate. The extraction procedure is described in literature.^[3]

Flavonoids

Stock extract solution of each investigated sage species was prepared from 1 g medium powdered crude plant material. To this plant material, 20 mL acetone, 2 mL HCl (281 g L^{-1}), and 1 mL methenamine (5 g L^{-1}) were added. The entity was kept boiling in the water bath under the reflux for 30 min. Hydrolysate was filtered to the volumetric flask (100 mL). The separated plant material was extracted for the second and the third time with the 20-mL portions of acetone kept boiling for 10 min. All extracts were filtered to the same volumetric flask and acetone was added to make up to 100 mL. Then, 20 mL of the obtained solution was transferred to the separation funnel; 20 mL water was added and the entity was extracted with ethyl acetate (first with the 15-mL, and then three times with the 10-mL portions of ethyl acetate). The separated organic layers were collected jointly and twice washed with the 40-mL portions of water. The organic layer was filtered to the 50-mL volumetric flask and filled up to the volume with ethyl acetate. Selective extraction of flavonoids from the investigated plant material was carried out in duplicate. The extraction procedure is described in literature.^[3]

Spectrophotometric Determination of the Overall Contents of Phenolic Acids and Flavonoids

Phenolic Acids

All spectrophotometric measurements presented in this study were performed with use of the Spectronic Genesys 6 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, USA). Phenolic acids were determined spectrophotometrically according to the procedure described

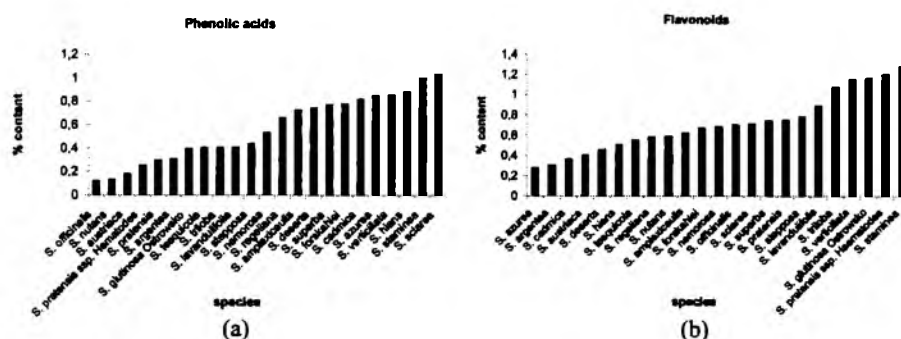


FIGURE 1 The bar diagram comparison based on the spectrophotometric results of the overall contents of (a) phenolic acids and (b) flavonoids in 23 sage species harvested in 2009.

in literature,^[3] using the selectively obtained extracts. Each result presented in this study is a mean value from the three independent spectrophotometric measurements obtained for each individual extract derived from a given sage species. An overall (%) content of phenolic acids was recalculated for caffeic acid, using the recalculation factor (k).

For each spectrophotometric measurement, two solutions were prepared. In the calibrated 10-mL test tubes, 0.1 mL extract, 5 mL water, 1 mL hydrochloric acid (0.5 M), 1 mL Arnov's reagent (aqueous solution containing 10 g sodium molybdate and 10 g sodium nitrate in 100 mL water), and 1 mL sodium hydroxide (1 M) was placed and made up with water to 10 mL. Absorbance of this solution was measured at $\lambda = 425$ nm. As a blind sample, the analogous mixture of the reagents was used without adding the extract sample. Percentage contents of phenolic acids (X) recalculated for caffeic acid were derived from the following formula:

$$X = \frac{A \cdot k}{0.1 \cdot m} \quad (1)$$

where A is the absorbance of the examined solution, k is the recalculation factor for caffeic acid ($k = 0.877$), and m is the weight of the crude plant material (in grams).

The obtained quantitative results (i.e., the overall contents of phenolic acids in the percentage scale) for all the investigated sage species are given in form of the bar diagram in Figure 1a.

Flavonoids

Flavonoids were determined spectrophotometrically according to the procedure described in literature,^[3] using the selectively obtained extracts.

Each result presented in this study is a mean value from the three independent spectrophotometric measurements obtained for each individual extract derived from a given sage species. An overall (%) content of flavonoids was recalculated for hyperoside, using the recalculation factor (k).

For each spectrophotometric measurement, two solutions were prepared. Solution 1 was prepared in the following way: To the 10-mL stock extract solution, 2 mL aluminum chloride (20 g L^{-1}) solution was added and filled up to 25 mL with the 1:19 mixture of acetic acid and methanol. Solution 2 was the reference sample and it was prepared, as follows: 10 mL stock extract solution was filled up to 25 mL with the 1:19 mixture of acetic acid and methanol. After 45 min from the preparation of these two solutions, absorbance of sample 1 was measured at the wavelength $\lambda = 425 \text{ nm}$, nm, using sample 2 as a blank. The percentage (%) contents of total flavonoids (X) were calculated, using the following formula:^[3]

$$X = \frac{A \cdot k}{m} \quad (2)$$

where A is the absorbance of the examined solution, k is the recalculation factor for hyperoside ($k = 1.25$), and m is the weight of the crude plant material (in grams).

The obtained quantitative results (i.e., the overall contents of flavonoids in the percentage scale) for all the investigated sage species are given in form of the bar diagram in Figure 1b.

Selective Multi-Step Extraction of Phenolic Acids and Flavonoids From Herbal Material

The detailed protocol of the selective multi-step extraction of phenolic acids and flavonoids was elaborated based on the information detailed in the literature.^[4–8] It is schematically summarized in Figure 2 and it was applied to the six sage species with the spectrophotometrically established highest overall levels of phenolic acids, five sage species with the spectrophotometrically established highest overall levels of flavonoids, and to *S. officinalis* (which demonstrated neither the highest overall levels of phenolic acids, nor flavonoids).

The 25-g portions of dried and finely powdered plant material were placed in the cartridges made of filter paper. In order to remove oily substances from the plants, they were preliminarily macerated for 24 hr with petroleum ether, and then exhaustively extracted with the same solvent in the Soxhlet apparatus. The petroleum ether extracts were discarded and the remaining plant material was dried at ambient temperature. These dried herbs were again macerated for 24 hr with methanol and then

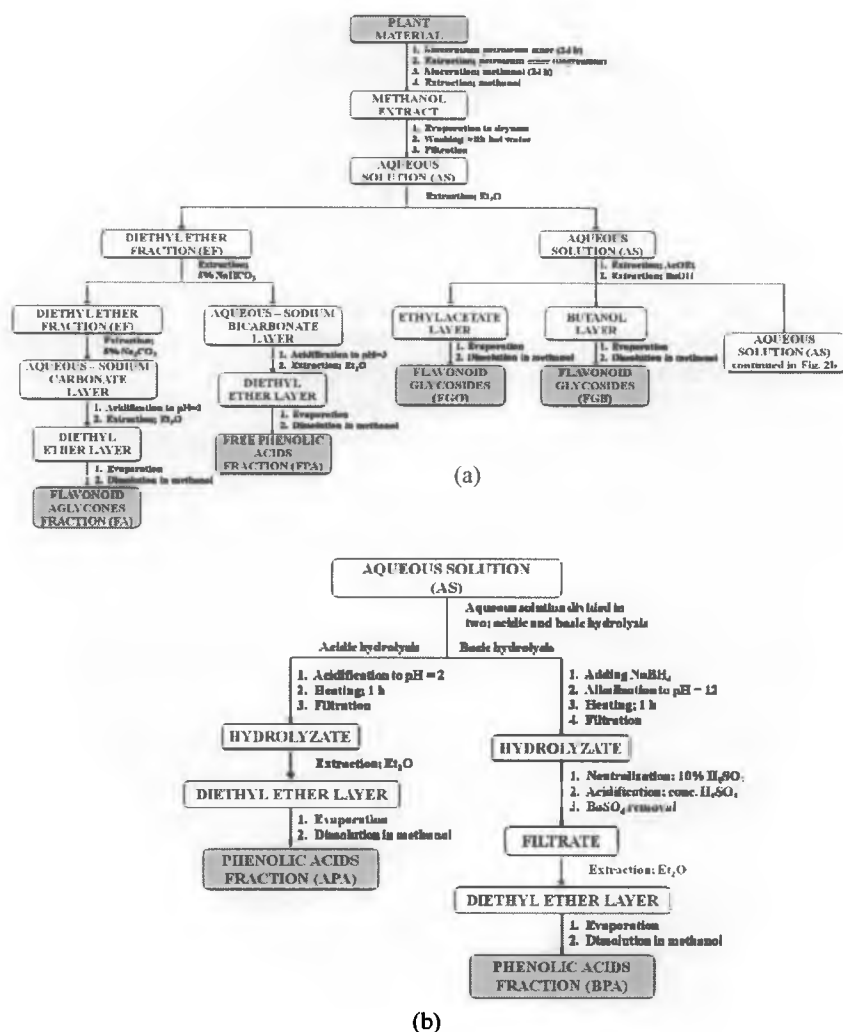


FIGURE 2 Schematic presentation of the selective multi-step extraction of phenolic acids and flavonoids from herbal material: (a) part 1 and (continued) (b) part 2.

exhaustively extracted with the same solvent in the Soxhlet apparatus. The methanol extracts were evaporated at 50°C under the reduced pressure to dryness. The residue was then washed out from the vacuum dryer flask with four portions of hot water (25 mL, each portion). These four portions were merged and left for 24 hr in the refrigerator. Then, the aqueous solution (AS) was filtered in order to remove the precipitated ballast substances and finally, it was extracted with the 20-mL portions of diethyl ether until obtaining a colorless diethyl ether layer. The merged ether fraction (EF) was first extracted with the 10-mL portions of 5% sodium bicarbonate in

order to transform phenolic acids to the water-soluble salts, and then it was extracted with the 10-mL portions of 5% sodium carbonate.

The aqueous bicarbonate layer was acidified with 18% hydrochloric acid to $\text{pH} = 3$, in order to obtain free phenolic acids. It was then extracted with the 20-mL portions of diethyl ether. The merged diethyl ether extracts were dried with the anhydrous sodium sulfate, filtered, and under the reduced pressure evaporated to dryness. The dry residue was dissolved in methanol and placed in the 10-mL volumetric flask. In that way, fraction of free phenolic acids (**FPA**) was obtained.

The aqueous carbonate layer was acidified with 18% hydrochloric acid to $\text{pH} = 2$ and then extracted with the 20-mL portions of diethyl ether. The merged diethyl ether extracts were dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated under the reduced pressure to dryness. The dry residue was dissolved in methanol and placed in the 10-mL volumetric flask. In that way, fraction of flavonoid aglycons (**FA**) was obtained.

AS left from the diethyl ether extraction was extracted with the 20-mL portions of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were merged, dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated under the reduced pressure to dryness. The dry residue was dissolved in methanol and placed in the 10-mL volumetric flask. In that way, the first fraction of "acidic" flavonoid glycosides (**FGO**) was obtained.

Consequently, **AS** was extracted with the 20-mL portions of butanol. The butanol extracts were merged then dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and under the reduced pressure evaporated to dryness. The dry residue was dissolved in methanol and placed in the 10-mL volumetric flask. In that way, the second fraction of "basic" flavonoid glycosides (**FGB**) was obtained.

In order to derive phenolic acids present in plant material in the bonded form (as esters and glycosides), **AS** was divided in the two equal portions which then underwent the acidic and basic hydrolysis, respectively.

The acidic hydrolysis was carried out in the following way: **AS** was acidified with 36% hydrochloric acid to $\text{pH} = 2$ and the entity was kept boiling under the reflux on the oil bath for 1 h. The hydrolysate was first cooled down and then extracted with the 20-mL portions of diethyl ether. The merged diethyl ether extracts were dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and under the reduced pressure, evaporated to dryness. The dry residue was dissolved in methanol and placed in the 10-mL volumetric flask. In that way, fraction of phenolic acids derived through the acidic hydrolysis (**APA**) was obtained.

To the second portion of **AS**, 1 g sodium borohydride (NaBH_4) was added in order to protect phenolic acids from oxidation. Then, the solution was alkalized with the 10% barium hydroxide to $\text{pH} \approx 12$ and the entity was kept boiling under the reflux on the oil bath for 1 hr. The

hydrolysate was cooled down, neutralized with the 10% sulfuric acid, and finally acidified with concentrated sulfuric acid to pH = 1.5. The precipitated barium sulfate was filtered off, and the filtrate was extracted with the 20-mL portions of diethyl ether. The merged diethyl ether extracts were dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and under the reduced pressure evaporated to dryness. The dry residue was dissolved in methanol and placed in the 10-mL volumetric flask. In that way, fraction of phenolic acids derived through the basic hydrolysis (BPA) was obtained.

High Performance Liquid Chromatographic Fingerprinting of Individual Fractions of Phenolic Acids and Flavonoids

The HPLC analysis was carried out with a Varian 920-LC model liquid chromatograph (Harbor City, CA, USA) equipped with a Varian 900-LC model autosampler, a gradient pump, a Varian 330 model DAD, and the Galaxie software for data acquisition and processing. The analyses were carried out in the gradient mode using a Pursuit C18 (5 μ m particle size) column (250 mm \times 4.6 mm id; Varian; cat. no. 1215-9307). Acetonitrile (A) and water with a 1% (v/v) amount of glacial acetic acid (B) were used in the following A + B (v/v) gradient program: from 0 to 7 min, 20 + 80; from 8 to 13 min, 40 + 60; from 14 to 19 min, 60 + 40; from 20 to 36 min, 100 + 0; and from 37 to 40 min, 20 + 80. The mobile phase flow rate was 0.8 mL min⁻¹. The chromatograms were registered at the wavelength λ = 220 nm.

Thin-Layer Chromatographic Fingerprinting of Individual Fractions of Phenolic Acids and Flavonoids

The commercial Si 60 F₂₅₄ coated glassplates (10 cm \times 20 cm; Merck, Darmstadt, Germany; cat. no. 1.05729) were used in the thin-layer chromatographic experiment. Before use, the plates were activated at 110°C for 15 min. The obtained plant extracts were applied to the chromatographic plates in the 10- μ L aliquots (FPA, APA, BPA, FGB, and FGO), and in the 20- μ L aliquot (FA) as the 1-cm long bands with use of an AS 30 model autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). All planar chromatograms were developed in the sandwich DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland), previously saturated with mobile phase vapor for 15 min. The chromatograms were developed 15 cm high and then dried at ambient temperature for 3 hr. After drying, each chromatogram was photographed with a digital camera at the wavelength λ = 366 nm in the TLC dark box (Camag, Muttenz, Switzerland), to provide the video images of the respective chromatograms. Then, the

chromatograms were sprayed with the 1% aluminum chloride solution in methanol (in order to obtain a better visualizing effect^[9]) and again photographed.

For the development of the three phenolic acids fractions (**FPA**, **APA**, and **BPA**), benzene + ethyl acetate + formic acid, 6:3:1 (*v/v*) was used as mobile phase.^[9] For the development of the flavonoid aglycons fraction (**FA**), toluene + ethyl acetate + formic acid, 12:6:1 (*v/v*) was applied.^[10] For the development of the flavonoid glycosides fractions (**FGB** and **FBO**), ethyl acetate + water + formic acid + acetic acid, 100:26:11:11 (*v/v*) was used as mobile phase.^[11]

RESULTS AND DISCUSSION

Spectrophotometric Determination of the Overall Contents of Phenolic Acids and Flavonoids

Twenty-three sage species underwent two separate extraction procedures, one targeting phenolic acids and the other flavonoids. Then, the spectrophotometric analysis was performed aimed to establish the total percentage contents of phenolic acids and flavonoids (as estimated against the dry mass of the examined samples). Upon the results obtained (see Table 1 and Figure 1), six different sage species (i.e., *S. sclarea*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. verticillata*, *S. azurea*, and *S. cadmica*; Figure 1a) were selected as those with the highest overall contents of phenolic acids. Similarly, five different sage species (i.e., *S. staminea*, *S. pratensis* ssp. *Haematoles*, *S. glutinosa*, *S. verticillata* and *S. triloba*; Figure 1b) were selected as those with the highest overall contents of flavonoids. Somewhat surprisingly, it was established that *S. officinalis*, the only sage species recognized as phytomedicine by Polish Pharmacopoeia, contains relatively low levels of phenolic acids and flavonoids. However, this particular species was also included in the consecutive investigation steps, basically for the sake of comparison.

Thus, the preliminary extraction allowed an in-advance selection of the plant specimens richest in the phenolics. This was a superficial assessment only, as both phenolic acids and flavonoids appear in the plant material in the different bonded forms. Then, the plant species chosen based on spectrophotometric results underwent the selective multi-step extraction (its consecutive steps are summarized in Figure 2). Ultimately, six different extracts per each selected sage species were fingerprinted by means of HPLC/DAD and TLC. For the sake of example, selected results are presented and discussed in the forthcoming sections.

Fingerprinting of the Sage Extracts by Means of High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC/DAD)

In order to demonstrate usefulness of the multi-step evaluation of the phenolics levels in the investigated plant material, in Figure 3a–c, we compared the HPLC/DAD fingerprints of the six phenolics fractions contained in *S. cadmica* (one of the species richest in phenolic acids), *S. glutinosa* (one of the species richest in flavonoids), and *S. officinalis* (the Polish pharmacopoeial plant).

From visual inspection of the fingerprints given in Figure 3a and 3b, it is evident that *S. cadmica* contains higher amounts of free and bonded phenolic acids (FPA, APA, and BPA) than *S. glutinosa*. In that way, a good agreement is obtained between spectrophotometric results and the HPLC/DAD fingerprints targeting phenolic acids selectively derived from these two sage species. From visual comparison of the HPLC/DAD fingerprints valid for flavonoid aglycons (FA), it looks that *S. cadmica* is somewhat richer in these compounds than *S. glutinosa* (contrary to the spectrophotometric assessment). However, it has to be admitted that the extraction of the flavonoids for the spectrophotometric purpose follows a less accurate extraction protocol than the selective multi-step extraction, which could easily give rise to the observed discrepancy. Further it is not clear which of these two sage

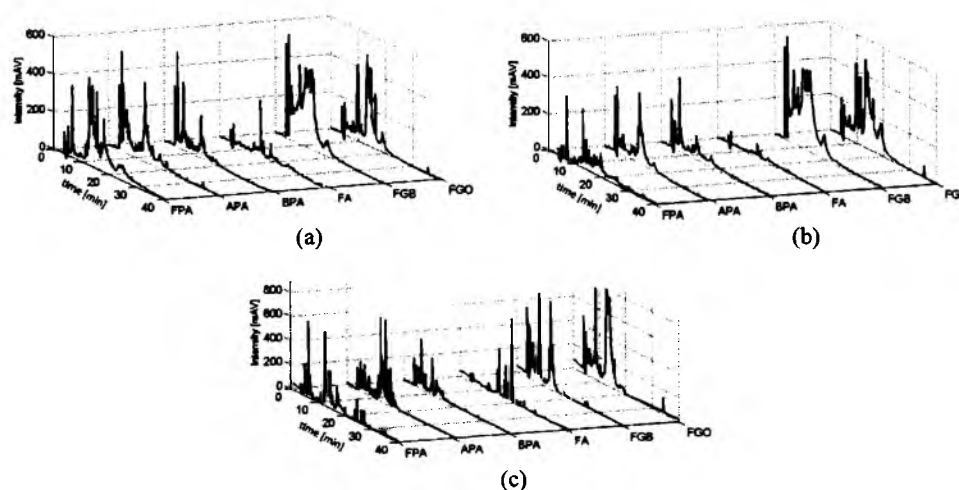


FIGURE 3 Comparison of the DAD fingerprints of the six different fractions derived by the selective multi-step extraction from (a) *S. cadmica*, (b) *S. glutinosa*, and (c) *S. officinalis*. Labeling of the individual fractions is in conformity with the extraction scheme given in Figure 2. FPA, free phenolic acids; APA, phenolic acids derived from the acidic hydrolysis; BPA, phenolic acids derived from the basic hydrolysis; FA, flavonoid aglycons; FGB, butanol extract of flavonoid glycosides; FGO, ethyl acetate extract of flavonoid glycosides.

species, *S. cadmica* or *S. glutinosa*, is richer in flavonoid glycosides (**FGB** and **FGO**). One can only confirm a difference in the patterns of the respective HPLC/DAD fingerprint pairs, yet a quantitative comparison could only be possible based on a thorough qualitative and quantitative analysis.

In Figure 3c, the six analogous fingerprints are given for *S. officinalis*, which evidently provide its unique characteristics. It can be stated that with *S. officinalis*, the bonded forms of phenolic acids and even more so those of flavonoid glycosides predominate over the free phenolic acids and flavonoid aglycons. From visual inspection, it can be stated that the fractions of flavonoid glycosides (**FGB** and **FGO**) contained in *S. officinalis* are comparably abundant to those contained in *S. glutinosa*. Similarly, visual inspection of the bonded phenolic acids (**APA** and **BPA**) contained in *S. officinalis* and *S. cadmica* shows that they are quantitatively comparable.

Fingerprinting of the Sage Extracts by Means of Thin-Layer Chromatography (TLC)

TLC is the only chromatographic technique that enables presentation of the obtained results in the picture form. With the adequately fractionated multicomponent mixtures, video images of the chromatograms can be regarded as fingerprints, because according to definition, a chromatographic fingerprint is a chromatogram that represents chemical characteristics of the herb.^[12] According to the majority published methods, chromatographic fingerprints of herbs have been constructed based on a single chromatogram.^[13–16] With the adequately fractionated complex mixtures, video images of the chromatograms can provide a unique basis of differentiation among the compared herbal species.

In Figure 4a–c, we present the three sets of the TLC fingerprints. Each set is composed of the six video images of the chromatograms valid for the **FPA**, **APA**, **BPA**, **FA**, **FGB**, and **FGO** fraction originating, respectively, from the selective multi-step extraction of *S. cadmica*, *S. glutinosa*, and *S. officinalis*. Three different mobile phases were used for the development of individual fractions, as given in the respective sub-section of Experimental. One mobile phase was used for the development of **FPA**, **APA**, and **BPA**, another for the development of **FA**, and the third for the development of **FGB** and **FGO**. A comparison of these three TLC fingerprint sets allows drawing the following conclusions.

From a comparison of Figure 4a and 4b, it comes out that the three fractions valid for the free and bonded phenolic acids (i.e., **FPA**, **APA**, and **BPA**) are more abundant with *S. cadmica* (Figure 4a) than with *S. glutinosa* (Figure 4b). The three compared chromatographic tracks for these two sage species look quite similar in qualitative terms, yet quantitatively

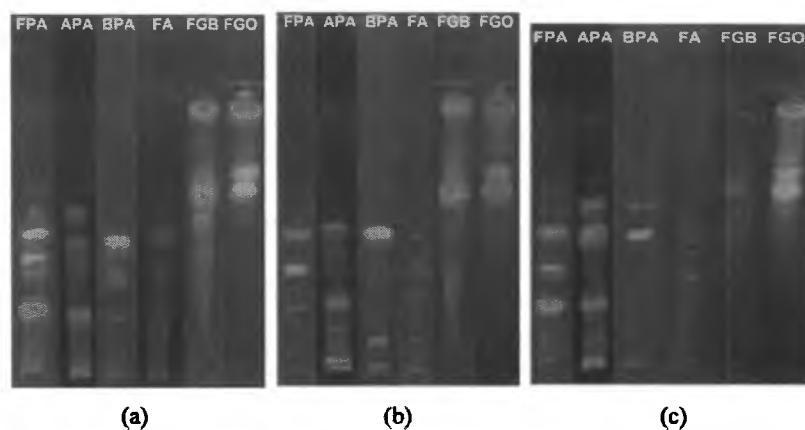


FIGURE 4 The comparison of the video images of the thin-layer chromatograms valid for the six different fractions derived by the selective multi-step extraction from (a) *S. cadmica*, (b) *S. glutinosa*, and (c) *S. officinalis*. Labeling of the individual fractions is in conformity with the extraction scheme given in Figure 2. FPA, free phenolic acids; APA, phenolic acids derived from the acidic hydrolysis; BPA, phenolic acids derived from the basic hydrolysis; FA, flavonoid aglycons; FGB, butanol extract of flavonoid glycosides; FGO, ethyl acetate extract of flavonoid glycosides. (Color figure available online.)

different. This result remains in conformity with those derived by means of spectrophotometric analysis and HPLC/DAD. A comparison of the two video images valid for flavonoid aglycons (FA) derived from *S. cadmica* and *S. glutinosa* confirms the HPLC/DAD result (and contradicts the spectrophotometric one); in this sense, the former species looks richer in flavonoid aglycons than the latter one. A comparison of the flavonoid glycosides (FGB and FGO) also proves higher abundance of these two fractions with *S. cadmica* than *S. glutinosa* (which is more easily perceptible from the simpler video images than from the more complex HPLC/DAD fingerprints).

In Figure 4c, the analogous fingerprints in the form of the video images are given valid for the six individual fractions derived from *S. officinalis*. Similar to the HPLC/DAD fingerprints, also, the TLC video images confirm the composition uniqueness of the phenolics originating from this particular medicinal plant. In the first instance, this uniqueness characterizes, with considerable diversity, the individual separated bands, which are comparable in the numbers to those characterizing *S. cadmica* and *S. glutinosa*, yet some of them assume different positions on the chromatogram (which is a proof of a perceptibly different qualitative composition). In quantitative terms, the totality of the individual constituents in each individual fraction derived from *S. officinalis* looks less abundant, yet comparable with those valid for *S. cadmica* and *S. glutinosa*. In that way, insufficiency of the pharmacopeially-recommended plant screening based on spectrophotometric quantification of the total phenolic acids and the total flavonoids is demonstrated once again.

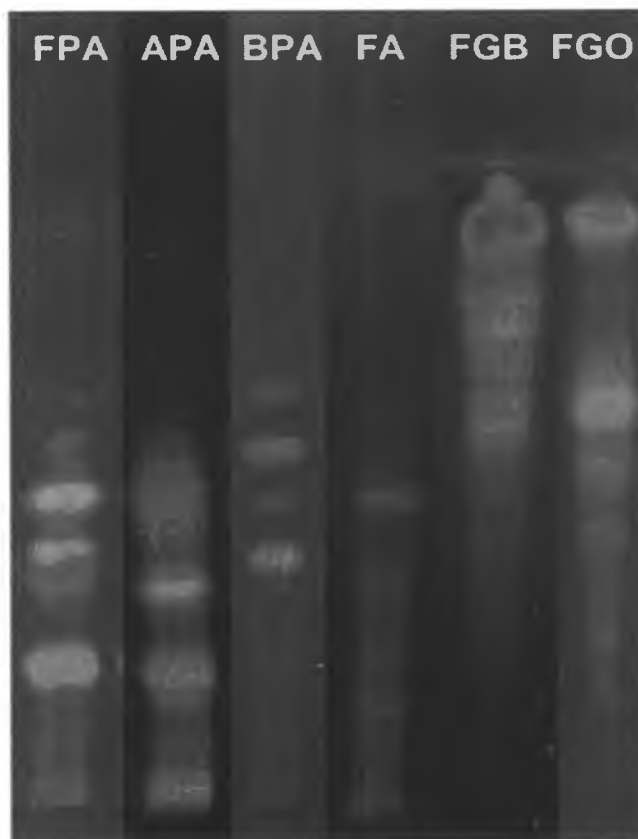


FIGURE 5 The comparison of the video images of the thin-layer chromatograms valid for the six most abundant phenolics fractions derived by the selective multi-step extraction, depending on the individual sage species; FPA (free phenolic acids), *S. cadmica*; APA (phenolic acids derived from the acidic hydrolysis), *S. hians*; BPA (phenolic acids derived from the basic hydrolysis), *S. staminea*; FA (flavonoid aglycons), *S. cadmica*; FGB (butanol extract of flavonoid glycosides), *S. sclarea*; and FGO (ethyl acetate extract of flavonoid glycosides), *S. cadmica*. (Color figure available online.)

In Figure 5, we present a set of the six video images of the chromatograms, which represents the quantitatively richest individual fractions of the free and bonded phenolics. From visual inspection of the chromatograms, it can be determined that *S. cadmica* outperforms the other investigated sage species with the highest levels of free phenolic acids (**FPA**), flavonoid aglycons (**FA**), and one fraction of flavonoid glycosides (**FGB**). The remaining three fractions (**APA**, **BPA**, and **FGO**) proved most abundant with *S. hians*, *S. staminea*, and *S. sclarea*, respectively. From these results a clear message follows that a single sage species does not necessarily represent the highest levels of all three phenolic acids and/or all three flavonoid fractions. To the contrary, different sage species can produce the

highest levels of one or more, but not necessarily all, individual phenolic fractions. In this sense, an even more thorough analytical scrutiny should follow, focusing on identification and quantification of the compounds present in each individual fraction with all the investigated sage species. Only upon such a thorough and complete assessment, the candidates can be nominated for the novel phytomedicines belonging to the *Salvia* genus. Upon our preliminary results, it seems that *S. cadmica* can be considered as a promising candidate.

CONCLUSIONS

The methodical approach to a comparison of different herbs belonging to one and the same *Salvia* genus presented in this study shows that the pharmacopeially recommended spectrophotometric assessment of the total contents of phenolic acids and flavonoids is insufficient and it does not properly reflect the real curative potential of the compared plant species. Based on the spectrophotometric assessment alone, *S. officinalis* is a far less promising phytomedicinal candidate than many other investigated sage species, and its reasonable curative potential can only be appreciated upon the results of a more thorough analytical assessment. It is evident that a complex analytical scrutiny can help select the other sage phytomedicinal candidates, producing high quantities of the free and bonded phenolic compounds. Upon the results presented in this study, *S. cadmica* certainly seems such a promising candidate. Last, but not least, our complex approach emphasizes usefulness of the TLC in the comparative phytochemical studies. It is shown that the simple and cost-friendly TLC approach can relatively quickly provide a valuable complementary fingerprint material, which on certain occasions might prove a sufficient alternative for the more expensive instrumental (e.g., spectrophotometric and HPLC/DAD) fingerprinting.

ACKNOWLEDGMENT

The work of D. Staszek was partially supported by the Ph.D. scholarship granted in 2010 within the framework of the University as a Partner of the Economy Based on Science project subsidized by the European Social Fund of the European Union.

REFERENCES

1. Michalak, A. Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing Under Heavy Metal Stress. *Polish J. Environ. Stud.* **2006**, *15*, 523–530.

2. Stalikas, C. D. Extraction, Separation, and Detection Methods for Phenolic Acids and Flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268–3295.
3. *Polish Pharmacopoeia VI*; Polish Pharmaceutical Society: Warsaw, 2002.
4. Jerzmanowska, Z. *Plant Material. The Isolation Methods*. PWN: Warszawa, 1967.
5. Świątek, L. The iridoid phenolic acids and glycosides in certain Polish medicinal herbs from the *Plantago* genus. *Herba Polon.* **1977**, *23*, 201–210.
6. Ibrahim, R. K.; Towers, G. H. The Identification by Chromatography of Plant Phenolic Acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *87*, 125–127.
7. Świątek, L.; Dombrowicz, E. Phenolic acids in the bitter raw materials. Part I. Analysis of the *Artemisia absinthium* herb and the Gentian root. *Farm. Pol.* **1984**, *40*, 729–732.
8. Schmidtlein, H.; Hermann, K. Quantitative Analysis for Phenolic Acids by thin Layer Chromatography. *J. Chromatogr.* **1975**, *115*, 123–128.
9. Wójcik-Kosior, M.; Oniszczyk, A. In *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., Eds.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, Florida, 2008, pp 348.
10. Rijke de, E.; Out, P.; Niessen, W. M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A.Th. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 31–63.
11. Cieśla, Ł.; Staszek, D.; Hajnos, M.; Kowalska, T.; Waksmundzka-Hajnos, M. Development of chromatographic and free radical scavenging activity fingerprints by thin-layer chromatography for selected *salvia* species. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 59–65.
12. Cui, S.; Fu, B.; Sen-Chun Lee, F.; Wang, X. Application of Microemulsion thin Layer Chromatography for the Fingerprinting of Licorice (*Glycyrrhiza* spp.). *J. Chromatogr. B* **2005**, *828*, 33–40.
13. Xie, P.; Chen, S.; Liang, Y. Z.; Wang, X.; Tian, R.; Upton, R. Chromatographic Fingerprint Analysis – A Rational Approach for Quality Assessment of Traditional Chinese Herbal Medicine. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 171–180.
14. Yang, L. W.; Wu, D. H.; Tang, X.; Peng, W.; Wang, X. R.; Ma, Y.; Su, W. W. Fingerprint Quality Control of Tianjihuang by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1070*, 35–42.
15. Chen, S. B.; Liu, H. P.; Tian, R. T.; Yang, D. J.; Chen, S. L.; Xu, H. X.; Chan, A. S.C.; Xie, P. S. High-Performance Thin-Layer Chromatographic Fingerprints of Isoflavonoids for Distinguishing between *Radix Puerariae* Lobate and *Radix Puerariae* Thomsonii. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1121*, 114–119.
16. Oprean, R.; Tamas, M.; Sandulescu, R.; Roman, L. Essential Oils Analysis. I. Evaluation of Essential Oils Composition Using Both GC and MS Fingerprints. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 651–657.

